

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude du couplage procédé/produit lors de la production des mousses par des agrégats protéiques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : Génie des Procédés

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Irina NICORESCU

Le 06 novembre 2009, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :	G. CUVELIER	<i>Professeur • AgroParisTech, Massy</i>
	C. SANCHEZ	<i>Professeur • Université Montpellier 2, Montpellier</i>
Examineurs :	G. DJELVEH	<i>Professeur • Clermont Université, Clermont-Ferrand</i>
	J. LEGRAND	<i>Professeur • GEPEA - Université de Nantes, S^t Nazaire</i>
	C. LOISEL	<i>MCF • ENITIAA, Nantes</i>
	A. RIAUBLANC	<i>Chargé de Recherche • INRA, Nantes</i>
	Ch. VIAL	<i>MCF HDR • Clermont Université, Clermont-Ferrand</i>
	J.F. BOUDIER	<i>Directeur Scientifique • IDI Ingredients (invité), Arras</i>

*Directeur de thèse: **M. Jack LEGRAND***

GEPEA - UMR CNRS 6144

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude du couplage procédé/produit lors de la production des mousses par des agrégats protéiques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : Génie des Procédés

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Irina NICORESCU

Le 06 novembre 2009, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :	G. CUVELIER	<i>Professeur • AgroParisTech, Massy</i>
	C. SANCHEZ	<i>Professeur • Université Montpellier 2, Montpellier</i>
Examineurs :	G. DJELVEH	<i>Professeur • Clermont Université, Clermont-Ferrand</i>
	J. LEGRAND	<i>Professeur • GEPEA - Université de Nantes, S^t Nazaire</i>
	C. LOISEL	<i>MCF • ENITIAA, Nantes</i>
	A. RIAUBLANC	<i>Chargé de Recherche • INRA, Nantes</i>
	Ch. VIAL	<i>MCF HDR • Clermont Université, Clermont-Ferrand</i>
	J.F. BOUDIER	<i>Directeur Scientifique • IDI Ingredients (invité), Arras</i>

*Directeur de thèse: **M. Jack LEGRAND***

GEPEA - UMR CNRS 6144

ECOLE DOCTORALE

SCIENCES POUR L'INGENIEUR, GEOSCIENCES, ARCHITECTURE

LISTE DES DIRECTEURS DE RECHERCHE

AMBIANCES ARCHITECTURALES ET URBAINES

Michel	BERENGIER	HDR	DR LCPC	LCPC	Division Exploitation Entretien Acoustique Routière	
Gérard	HEGRON		PR	Ecole Architecture Nantes	CERMA Nantes	UMR 1563
Jean-Pierre	PENEAU		PR émérite		CERMA Nantes	UMR 1563

DYNAMIQUE DES FLUIDES ET DES TRANSFERTS

Bertrand	ALESSANDRINI	HDR	IR	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Jacques	ASTOLFI	HDR	MC	Ecole Navale de Brest	IRENAV Brest	EA 3634
Jean-Yves	BILLARD		PR	Ecole Navale de Brest	IRENAV Brest	EA 3634
Alain	CLEMENT	HDR	IR	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Gérard	DELHOMMEAU	DE	IR	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Henda	DJERIDI	HDR	MC	Ecole Navale de Brest	IRENAV Brest	EA 3634
Pierre	FERRANT	HDR	MC	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Jean-François	HETET		PR	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Dominique	MARICHAL		PR	Ecole Centrale de Nantes		
Patrice	MESTAYER		DR CNRS	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Jean	PIQUET		PR	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Jean-Michel	ROSANT	DE	CR CNRS	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Jean-François	SINI		PR	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598
Michel	VISONNEAU		DR CNRS	Ecole Centrale de Nantes	L. M. F.	UMR 6598

GENIE CIVIL

Alain	ALEXIS		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Guy	BASTIAN		PR émérite	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Pierre	CHAMBON	HDR	MC	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Francis	DE LARRARD	HDR	Pr. Ag.	LCPC	Division Technologies du GC et de l'Environnement	
Jacques	GARNIER	HDR	DR LCPC	LCPC	Division Reconnaissance et Mécanique des Sols	
Pierre-Yves	HICHER		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Agnès	JULLIEN	HDR	DR LCPC	LCPC	Division Technologies du GC et de l'Environnement	
Abdelhafid	KHELIDJ		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Van Anh	LE		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Ahmed	LOUKILI	HDR	MC	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Gilles	PIJAUDIER-CABOT		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Abdul-Hamid	SOUBRA		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Philippe	TAMAGNY	HDR	DR LCPC	LCPC	Division Mécanique et Structure des Chaussées	
Pierre	THOMAS		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Christian	WIELGOSZ		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183

GEOSCIENCES

Odile	ABRAHAM	HDR	IDTPE	LCPC	Division Reconnaissance et Mécanique des Sols	
Véronique	CARRERE	HDR	MC	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Philippe	CÔTE	DE	DR LCPC	LCPC	Division Reconnaissance et Mécanique des Sols	
Hervé	DIOT		PR	Univ. La Rochelle	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Patrick	GENOT		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Jacques	GIRARDEAU		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Olivier	GRASSET		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Eric	HUMLER		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Richard	LAGABRIELLE	DE	DR LCPC	Directeur Technique - LCPC		
Bernard	LASNIER		PR émérite	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Patrick	LAUNEAU		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Daniel	MEGE	HDR	MC	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Eric	MERCIER		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Antoine	MOCQUET		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Martin	SANCHEZ	HDR	MC	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112
Christophe	SOTIN		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	Lab. Planét. et Géodyn.	UMR 6112

GENIE MECANIQUE

Fouad	BENNIS		PR	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Alain	BERNARD		PR	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Christian	BURTIN	HDR	MC	Ecole Centrale de Nantes		
Patrice	CARTRAUD		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Pascal	CASARI	HDR	MC	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Patrick	CHEDMAIL		PR	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Chi Yuen	CHIEM		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Philippe	DEPINCE	HDR	MC	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Benoît	FURET		PR	IUT Nantes - Univ. Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Laurent	GORNET	HDR	MC	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Ronald	GUILLEN		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Jean-Yves	HASCOËT		PR	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Frédéric	JACQUEMIN	HDR		IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GeM	UMR 6183
Bernard	LAMY		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Donatien	LE HOUËDEC		PR émérite	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Surandar	MARYA		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Nicolas	MOES		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Pascal	MOGNOL	HDR	MC	ENS CACHAN	IRCCyN	UMR 6597
Bernard	PESEUX		PR Émérite	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Jean-François	PETIOT		PR	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597
Arnaud	POITOU		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Guillaume	RACINEUX		PR	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Erwan	VERRON	HDR	MC	Ecole Centrale de Nantes	GeM	UMR 6183
Philippe	WENGER		DR CNRS	Ecole Centrale de Nantes	IRCCyN	UMR 6597

THERMIQUE, ÉNERGÉTIQUE ET GÉNIE DES PROCÉDÉS

Yves	ANDRES	HDR	MA	Ecole des Mines de Nantes	GEPEA	UMR 6144
Hervé	ANDRIEU	HDR	IDTPE	LCPC	Division Eau	
Marie	DELAMBALLERIE	HDR	PR	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Marc	ANTON		DR	INRA Nantes	Unité BIA	
Abdellah	ARHALIASS		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Jean-Pierre	BARDON		PR Émérite	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Jérôme	BELLETRE	HDR	MA	Ecole des Mines de Nantes	Dép. Syst. Energ & Environnement	UMR 6144
Lionel	BOILLEREAUX		PR	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Brahim	BOUROUGA		PR	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Jacques	COMITI		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Didier	DELAUNAY		DR CNRS	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Arnaud	DELEBARRE		PR	Ecole des Mines de Nantes	GEPEA	UMR 6144

Guy	DELLA VALLE	HDR	IR	INRA Nantes	Unité BIA	
Anne	DESRUMAUX	HDR	MC	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Rémi	DETERRE		PR	IUT Nantes - Univ. Nantes	OPERP	
Jean-Louis	DOUBLIER		DR	INRA Nantes	Unité BIA	
Louis	DOUBLIEZ		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Francine	FAYOLLE	HDR	MC	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Alain	FOUCAULT	HDR	IR CNRS	CRTT Saint-Nazaire	GEPEA	UMR 6144
Bertrand	GARNIER	HDR	CR	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Jean-Luc	ILARI	HDR	PR	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Pascal	JAOUEN		PR	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Yvon	JARNY		PR	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Abdeljalil	LAHMAR		PR	IUT La Roche/Yon - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Alain	LE BAIL	HDR	PR	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Laurence	LE COQ	HDR	MA	Ecole des Mines de Nantes	Dép. Syst. Energ & Environnement	UMR 6144
Olivier	LE CORRE	HDR	MA	Ecole des Mines de Nantes	Dept Syst. Energet. et Environnement	
Yves	LECOINTE		PR	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Patrick	LEGENTILHOMME		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Jack	LEGRAND		PR	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Michel	LEGRET	HDR	DR LCPC	LCPC	Division Eau	
Denis	LOURDIN		CR	INRA Nantes	BIA	
Agnès	MONTILLET	HDR	MC	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Ahmed	OULD EL MOCTAR	HDR	MC	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Hassan	PEERHOSSAINI		PR	Ecole Polytechnique - Univ. Nantes	Lab. Thermocinétique	UMR 6607
Denis	PONCELET		PR	ENITIAA Nantes	GEPEA	UMR 6144
Jérémy	PRUVOST	HDR	MC	Fac. Sc. et Techn - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Francis	QUEMENEUR		PR Emérite	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Véronique	RUBAN	HDR	DR LCPC	LCPC	Division Eau	
Jean-Pierre	SCHLUMPF	HDR	MC	IUT Saint-Nazaire - Univ. Nantes	GEPEA	UMR 6144
Camille	SOLLIEC	HDR	MA	Ecole des Mines de Nantes	GEPEA	UMR 6144
Mohan	TAZEROUT	HDR	MA	Ecole des Mines de Nantes	Dép. Syst. Energ & Environnement	

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Génie des Procédés Alimentaires à l'ENTIAA « Ecole Nationale d'Ingénieurs des Techniques des Industries Agricoles et Alimentaires » de Nantes.

*Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur le professeur **J. Legrand** et à Madame **C. Loisel**, maître de conférence pour m'y avoir accueillie, je les remercie de m'avoir fourni les meilleures conditions possibles pour la réalisation de ce travail ainsi que pour leurs remarquables qualités humaines.*

*Que Monsieur **Ch. Vial**, maître de conférence (Hdr) et Monsieur **A. Riaublanc**, chargé de recherche trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus vifs. Par leur grande compétence ils m'ont prodigué un soutien scientifique déterminant pour la réalisation de cette étude. Je souhaiterais également remercier chaleureusement Messieurs **A. Riaublanc** et **B. Novales** ainsi que les techniciens qui m'ont aidée à réaliser mes essais à l'INRA de Nantes et plus particulièrement Madame **V. Beaumal** pour son aide précieuse et sa gentillesse à mon égard.*

*Je tiens à remercier Monsieur le professeur **G. Cuvelier** et Monsieur le professeur **G. Djelveh** pour leurs supports scientifiques. J'ai pu apprécier leurs nombreux conseils, toujours utiles pour l'orientation de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma plus grande reconnaissance.*

*Je remercie Messieurs les professeurs **G. Cuvelier** et **C. Sanchez** de faire partie du jury et d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs.*

*Mes meilleurs remerciements s'adressent aux industriels qui ont supporté financièrement ce travail : Messieurs **Th. Hennebel** et **J-F. Boudier** de la société IDI Ingrédients.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur **Bernard Gruzza**, Professeur à Polytech'Clermont, pour sa gentillesse, son soutien moral et pour ses conseils très précieux depuis mon arrivée en France.*

*J'adresse également mes remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire. Je tiens à exprimer ma sympathie envers les enseignants, les chercheurs (**Gisèle, Guy, Marta, Ruben**), les doctorants (**Fadhel, Mauricio, Ming, Mourad, Raouf, Sandra, Sariah, Sid Ahmed**) et les techniciennes (**Muriel** et **Patricia**) du département GPA pour les bonnes relations ainsi que leur extrême gentillesse.*

*Je souhaite également adresser une forte pensée à **A. Desrumaux** pour la confiance qu'elle m'a témoignée en m'engageant pour mener à bien ce travail de recherche ainsi que à mes parents qui ne sont plus parmi nous.*

Irina Nicorescu

TABLE DES MATIERES

<i>Nomenclature</i>	1
<i>Introduction</i>	4
<i>Chapitre 1. Bibliographie</i>	8
<u>I. Les protéines globulaires</u>	8
<i>I.1. Généralités sur les protéines globulaires</i>	8
I.1.1. Généralités sur les protéines sériques.....	9
I.1.1.1. La β -lactoglobuline.....	9
I.1.1.2. L' α -lactalbumine.....	12
I.1.1.3. L'albumine sérique bovine.....	12
I.1.1.4. Les immunoglobulines.....	13
I.1.2. Dénaturation et agrégation des protéines sériques.....	13
I.1.2.1. Dénaturation et agrégation de la β -lactoglobuline par la chaleur.....	14
I.1.2.2. Effet du chlorure de sodium sur la dénaturation et l'agrégation de la β -Lg.....	15
I.1.2.3. Traitements thermiques à pH neutre.....	17
I.1.2.4. Mécanismes d'agrégation de la β -Lg.....	18
I.1.2.5. Formation et morphologie des agrégats solubles.....	19
I.1.2.6. Effet du traitement mécanique sur l'agrégation des protéines.....	23
I.1.3. Impact de la dénaturation et de l'agrégation des solutions protéiques sur leurs propriétés interfaciales.....	24
<u>II. Mousses de protéines sériques</u>	28
<i>II.1. Généralités sur les mousses alimentaires</i>	28
II.1.1. Qu'est ce qu'une mousse ?.....	28
II.1.2. Fabrication et stabilisation d'une mousse protéique.....	30
II.1.3. Propriétés structurales et physico-chimique des mousses liquides.....	31
<i>II.2. Grandeurs caractéristiques des mousses produites industriellement</i>	34
II.2.1. Taux de foisonnement.....	35
II.2.2. Distribution spatiale du gaz.....	36
II.2.3. Propriétés rhéologiques des mousses.....	39
II.2.4. Stabilité des mousses dans le temps.....	42

II.2.4.1. Le drainage.....	43
II.2.4.1.1. Description mathématique des courbes de drainage.....	45
II.2.4.1.2. Facteurs influençant le phénomène de drainage.....	47
II.2.4.2. Le mûrissement d'Ostwald.....	49
II.2.4.3. La coalescence.....	50
<i>II.3. Rôle des ingrédients dans les produits foisonnés.....</i>	<i>51</i>
II.3.1. Rôle des protéines en général et des protéines laitières en particulier.....	51
II.3.1.1. Aptitude des protéines au foisonnement.....	51
II.3.1.2. Aptitude au foisonnement des protéines sériques.....	53
II.3.2. Rôle des agents stabilisants.....	53
II.3.2.1. Xanthane.....	54
II.3.3. Rôle des sucres courts.....	55
II.3.4. Rôle stabilisant de la matière grasse dans les émulsions foisonnées.....	56
II.3.5. Intérêt de la dénaturation et de l'agrégation des protéines dans le foisonnement.....	58
<i>II.4. Aspects technologiques du procédé de foisonnement.....</i>	<i>61</i>
II.4.1. Introduction.....	61
II.4.2. Matériels et aspects technologiques du procédé d'aération discontinu.....	62
II.4.2.1. Méthode par battage (ou fouettage).....	62
II.4.2.2. Méthode par bullage.....	63
II.4.3. Matériels et aspects technologiques du procédé continu de foisonnement.....	64
II.4.3.1. Le système rotor-stator.....	64
II.4.3.2. Une alternative: l'échangeur à surface raclée (ESR).....	66
II.4.3.3. Une technologie encore sous-exploitée : les mélangeurs statiques.....	68
II.4.3.4. Une technologie pionnière : les techniques membranaires.....	70
<i>II.5. Conclusions de la synthèse bibliographique.....</i>	<i>71</i>

Chapitre 2. Matériels et Techniques expérimentales.....73

I. Matériel.....73

<i>I.1. Protéines sériques.....</i>	<i>73</i>
<i>I.2. Hydratation de la poudre d'isolat protéique.....</i>	<i>73</i>
<i>I.3. Dénaturation et agrégation des protéines par traitement thermique.....</i>	<i>74</i>

II. Techniques expérimentales.....77

<i>II.1. Caractérisation des protéines et des agrégats en solution.....</i>	<i>77</i>
---	-----------

II.1.1. Calorimétrie thermique différentielle (DSC).....	77
II.1.1.1. Principe de l'appareil.....	77
II.1.2. Distribution granulométrique.....	78
II.1.2.1. Diffraction de la lumière.....	79
II.1.2.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	80
II.1.3. Chromatographie de filtration sur gel.....	81
II.1.3.1. Principe de l'appareil.....	82
II.1.3.2. Mode opératoire.....	82
II.1.4. Electrophorèse des protéines (SDS-PAGE).....	82
II.1.5. Caractérisation des fractions insolubles par microscopie optique.....	84
II.1.6. Caractérisation des fractions solubles par analyse d'images.....	85
II.1.6.1. Principe de l'appareil.....	85
II.1.7. Caractérisation des fractions solubles par AFM.....	86
II.1.7.1. Principe et différents modes.....	86
II.1.7.2. Prélèvements et observations.....	88
II.1.8. Rhéologie des solutions d'isolat de protéines sériques en mode d'écoulement.....	89
II.1.9. Tension de surface.....	90
<i>II.2. Dispositifs expérimentaux de foisonnement.....</i>	<i>92</i>
II.2. 1. Procédés discontinus de foisonnement.....	92
II.2.1.1. Obtention de la mousse par battage.....	92
II.2.1.2. Evaluation de l'aptitude au foisonnement et de la stabilité des mousses par bullage.....	93
II.2.2. Procédés de foisonnement en continu.....	94
II.2.2.1. L'unité de type rotor-stator.....	94
II.2.2.2. Installation de type colonne à faible entrefer.....	96
II.2.2.3. Paramètres opératoires du foisonnement.....	97
<i>II.3. Caractérisation des mousses d'isolat protéique.....</i>	<i>99</i>
II.3.1. Taux de foisonnement.....	99
II.3.2. Stabilité contre le drainage.....	99
II.3.3. Rhéologie des mousses en mode dynamique.....	101
II.3.3.1. Détermination de la zone de linéarité.....	101
II.3.3.2. Mesures dynamiques.....	103
II.3.4. Analyse de la microstructure des mousses.....	103
II.3.5. Plan d'expériences.....	104

Chapitre 3. Résultats et Discussion.....	108
<u>I. Caractérisation des solutions de protéines sériques (WPI).....</u>	<u>108</u>
I.1. Effet couplé force ionique–température de dénaturation.....	108
I.2. Effet de la température de dénaturation seule.....	117
<u>II. Caractérisation des mousses protéiques obtenues en batch.....</u>	<u>144</u>
II.1. Détermination du temps optimal de battage d’une solution de WPI.....	144
II.2. Effets des ingrédients et de leurs interactions sur les caractéristiques des mousses d’isolat de protéines sériques.....	149
II.3. Effet couplé « force ionique–température de dénaturation ».....	152
II.4. Effet de la température de dénaturation seule. Détermination de la température de dénaturation la plus adaptée au foisonnement.....	168
II.5. Étude détaillée des rôles respectifs des agrégats protéiques soluble et insoluble sur la formation et la stabilisation des mousses de WPI.....	180
II.6. Impact d’un traitement thermique sévère de type « post-traitement » sur les propriétés des mousses de WPI.....	191
<u>III. Caractérisation des mousses protéiques produites en continu–rotor/stator.....</u>	<u>195</u>
III.1. Microstructure des mousses.....	196
III.1.1. Impact du traitement thermique.....	196
III.1.2. Influence des conditions opératoires.....	199
III.1.3. Conclusions.....	205
III.2. Texture des mousses.....	206
III.2.1. Impact du traitement thermique.....	206
III.2.2. Influence des conditions opératoires.....	207
III.2.3. Conclusions.....	210
III.3. Stabilité des mousses.....	210
III.3.1. Stabilité à court terme.....	210
III.3.2. Stabilité à long terme des mousses.....	211
III.3.3. Conclusions.....	215
III.4. Conclusions sur le foisonnement en continu.....	216
<u>IV. Caractérisation des mousses protéiques produites en continu–colonne à faible entrefer.....</u>	<u>217</u>
IV.1. Microstructure des mousses.....	218
IV.1.1. Impact du traitement thermique.....	218

IV.1.2. Influence des conditions opératoires.....	219
IV.1.3. Conclusions.....	224
<i>IV.2. Texture des mousses.....</i>	<i>225</i>
IV.2.1. Effet du traitement thermique.....	225
IV.2.2. Influence des conditions opératoires.....	226
IV.2.3. Conclusions.....	228
<i>IV.3. Stabilité des mousses.....</i>	<i>229</i>
IV.3.1. Stabilité à court terme.....	229
IV.3.2. Stabilité à long terme des mousses.....	231
IV.3.3. Conclusions.....	235
IV.4. Conclusions sur le foisonnement en continu.....	236
 Conclusion Générale.....	 237
<i>Perspectives.....</i>	<i>243</i>
<i>Valorisation scientifique des travaux réalisés.....</i>	<i>246</i>
<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>248</i>

NOMENCLATURE

Caractères latins

a	[-]	constante
d	[m]	diamètre de la bulle/des particules
d_{32}	[m]	diamètre de Sauter ou diamètre moyen en surface
d_{43}	[m]	diamètre moyen en volume
d_{90}, d_{50}, d_{10}	[m]	diamètres de particules pour lesquels respectivement 90%, 50% et 10% du volume de la phase grasse est dispersée sous forme de gouttelettes de tailles inférieures à ces dimensions
F	[%]	fraction de liquide drainée
F_{infini}	[%]	fraction drainée pour un temps infini de drainage
F_1	[N]	force
G	[m ³ ·s ⁻¹]	débit volumique de la phase de gaz
G'	[Pa]	module de conservation (élastique)
G''	[Pa]	module de perte (visqueux)
G^*	[Pa]	module complexe
ΔG	[J·mol ⁻¹]	différence d'énergie libre
h	[mm]	hauteur
ΔH	[J·g ⁻¹]	enthalpie de dénaturation
k	[min ⁻¹]	constante cinétique
k_I	[-]	constante de raideur de la pointe de l'AFM
L	[m ³ ·s ⁻¹]	débit volumique de la phase liquide
L_1	[m]	périmètre mouillé
m_D	[g]	masse de liquide drainé
m_M	[g]	masse initiale de la mousse
M	[N·m]	couple de rotation
M_w	[g·mol ⁻¹]	masse moléculaire
N	[tours·min ⁻¹]	vitesse d'agitation
P	[Pa]	contre-pression
ΔP	[Pa]	pression de Laplace
$P_{d-p}-P_{pb}$	[Pa]	différence de pression

P_{pb}	[Pa]	pression du liquide au niveau du bord de Plateau
Q	[m ³ ·s ⁻¹]	débit volumique
r_p	[mm]	rayon de courbure
R_h	[mm]	rayon hydrodynamique
R_1	[mm]	rayon du cylindre de révolution n°.1
R_2	[mm]	rayon du cylindre de révolution n°. 2
St	[%]	stabilité de la mousse à court terme
ΔS	[J·mol ⁻¹]	variation d'entropie
$t I^{ère} goutte$	[s]	temps de début de drainage (stabilité à court terme)
$t_{1/2}$	[s]	temps de demi-vie
T	[°C]	température
T_d	[°C]	température moyenne de dénaturation
TF	[%]	taux de foisonnement
V	[mL]	volume de liquide drainé pendant un temps t
V_0	[mL]	volume initial de solution présent dans la mousse
V_{dr}	[mL]	volume de solution drainée
V_u	[mL]	volume utile du foisonneur accessible au fluide
Δz	[-]	déflexion du microlevier de l'AFM

Symboles grecs

$\tan \delta$	[-]	angle de perte
φ	[%]	fraction volumique de gaz
φ_c	[%]	fraction volumique de gaz caractéristique
ε	[%]	taux de gaz
ε_{max}	[%]	taux de gaz maximum
η	[Pa·s]	viscosité
ρ	[kg·m ⁻³]	masse volumique
ρ_{base}	[kg·m ⁻³]	masse volumique de la base à foisonner
ρ_{mousse}	[kg·m ⁻³]	masse volumique de la mousse
σ	[N·m ⁻¹]	tension de surface
ω_0	[rad·s ⁻¹]	vitesse angulaire
τ	[Pa]	contrainte de cisaillement
τ_a	[s]	temps de séjour apparent

θ	[°]	angle de contact
$\dot{\gamma}$	[s ⁻¹]	vitesse de cisaillement

Abréviations

AFM	microscopie à force atomique
ANOVA	analyse de la variance
α -La	α -lactalbumine
BSA	albumine sérique bovine
β -Lg	β -lactoglobuline
β -ME	β -mercaptoéthanol
CLSM	microscopie confocale à balayage laser
CMC	concentration micellaire critique
Cryo-TEM	microscopie électronique à transmission par cryogénie
μ -DSC	micro calorimétrie différentielle à balayage
DLS	diffusion dynamique de la lumière
HTST	high temperature short time
Ig	immunoglobulines
pI	point isoélectrique
S	surnageant
SEC	chromatographie d'exclusion stérique
SDS	sodium dodécyl sulfate
TEM	microscopie électronique à transmission
TF	taux de foisonnement
UHT	ultra-high temperature
WPC	concentrat de protéines sériques
WPI	isolat de protéines sériques (whey protein isolate)

INTRODUCTION

Les *protéines de lactosérum*, ou *protéines sériques*, sont très utilisées en qualité d'ingrédient dans le domaine de l'alimentaire, notamment en raison de l'intérêt de leurs propriétés fonctionnelles (*de Wit, 1984; Bottomley et coll., 1990*), parmi lesquelles leurs pouvoirs émulsifiant et moussant élevés, en plus de leurs qualités nutritionnelles. Ces propriétés peuvent également être améliorées lorsqu'un traitement thermique est appliqué aux protéines. Toutefois, pour que le traitement thermique soit favorable, celui-ci doit être conduit dans des conditions strictement contrôlées, notamment dans un environnement minéral et à un pH tous deux propices à la dénaturation et l'agrégation maîtrisées des espèces protéiques. En effet, les protéines sériques peuvent être partiellement ou totalement dénaturées selon la durée et l'intensité du traitement par la chaleur, ce qui peut conduire à une grande variété d'espèces protéiques présentant des tailles et des propriétés très différentes, telles que les protéines dénaturées non-agrégées, mais aussi des agrégats protéiques solubles et des agrégats insolubles.

Dans ce travail, notre objectif est centré sur l'application des assemblages protéiques obtenus à partir de protéines de lactosérum pour la production des mousses laitières en l'absence de matière grasse, dans le but de former des produits aérés, c'est-à-dire foisonnés, de type « allégés ». Ces produits constituent un débouché prometteur pour les industries agroalimentaires et connaissent un développement croissant dans le cadre de nombreuses applications, telles que les produits laitiers frais, les desserts lactés, les crèmes glacées, ou encore les mousses à base de fruits et de légumes. En effet, les assemblages protéiques, en particulier les agrégats solubles, semblent être capables d'agir favorablement sur les caractéristiques du produit, par exemple sur la texture, mais aussi sur la stabilité à l'entreposage des produits foisonnés grâce à la modification de leur microstructure. D'un point de vue industriel, la substitution d'une fraction des protéines d'un aliment par des protéines de lactosérum agrégées plus efficaces pourrait aussi réduire les coûts de production, tout en ajustant la qualité des produits aux besoins et aux demandes des consommateurs. Par exemple, la séparation de phase, indice d'une stabilité insuffisante, constitue encore la principale source des réclamations reçues par les industriels sur ce type de produits et pourrait être sensiblement diminuée. L'objectif est aussi d'utiliser ces assemblages protéiques afin de réduire la teneur en matière grasse des aliments tout en leur assurant de bonnes

caractéristiques organoleptiques ; les industriels pourraient ainsi satisfaire des consommateurs qui sont de plus en plus sensibilisés à l'importance d'une alimentation saine.

Toutefois, afin de maîtriser les propriétés d'usage et notamment la microstructure des produits foisonnés, il est important de comprendre les interactions procédé/produit, et de mettre en évidence les paramètres d'influence. La première étape consiste à disposer de méthodes capables de générer des agrégats protéiques adaptés à la production de produits aérés ; dans ce but, les mécanismes de dénaturation et d'agrégation des protéines doivent être contrôlés en jouant non seulement sur les conditions thermiques du traitement appliqué (température, durée), mais aussi sur les conditions mécaniques (hydrodynamique...) de ce même traitement qui sont fonction de la technologie utilisée, ainsi que sur la formulation des solutions protéiques à traiter (concentration, force ionique, pH...). La deuxième étape concerne l'utilisation proprement dite des protéines modifiées dans les aliments foisonnés ; globalement, les verrous technologiques sont de deux types :

- ✓ *La formulation de ces aliments* fait intervenir un pourcentage élevé de matières grasses, ainsi qu'un nombre croissant d'additifs. La demande du marché européen étant plutôt orientée vers les produits allégés en matières grasses, il faut nécessairement compenser la baisse de la teneur en matières grasses par l'addition d'agents de texture pour permettre à la fois l'incorporation du gaz et sa stabilisation dans la mousse. L'utilisation des assemblages protéiques dans la fabrication des desserts laitiers foisonnés et autres produits laitiers tels que les yaourts, si elle reste prometteuse, reste mal maîtrisée en terme de formulation et, en particulier, les questions suivantes restent pour l'instant sans réponse :
 - quel est le rôle exact des fractions protéiques solubles et insolubles dans ces systèmes complexes ?
 - existe-t-il un couple agrégats protéiques/conditions opératoires qui permette de stabiliser les produits foisonnés en l'absence de matière grasse ?
 - quels sont les mécanismes permettant une meilleure stabilisation de la mousse en présence d'assemblages protéiques et ceux qui conduisent à la formation d'assemblages plus efficaces ?
- ✓ *Du point de vue du procédé*, la production des mousses est directement corrélée aux propriétés de la matière première à foisonner, ainsi qu'aux technologies et aux conditions opératoires appliquées (température, pression...) pendant l'étape de foisonnement. De plus, les propriétés de la matière première à foisonner dépendent aussi de son « histoire thermomécanique ». Par conséquent, il est important de cerner les points suivants :

- peut-on prédire a priori la conséquence d'un traitement par la chaleur sur l'aptitude au foisonnement des protéines et des assemblages protéiques, ainsi que sur les propriétés d'usage du produit foisonné, telles que la texture et la stabilité ?
- peut-on utiliser le traitement par la chaleur pour texturer et stabiliser des mousses laitières et s'affranchir de l'utilisation de nombreux additifs et d'une bonne partie de la matière grasse sans modifier sensiblement les propriétés organoleptiques ?
- comment quantifier l'effet d'un traitement thermique « dynamique » en échangeur de chaleur sur l'agrégation des protéines sériques ?
- comment faire pour choisir l'équipement le plus adapté pour aérer une formulation contenant des assemblages protéiques ?
- quels sont les problèmes nouveaux qui peuvent résulter de l'utilisation des assemblages protéiques dans ces mousses ?

Ce travail a pour but de répondre, au moins partiellement, à certaines de ces questions. Sa première partie sera dédiée à l'étude de l'étape de production des assemblages protéiques, en particulier à l'analyse des conditions de dénaturation et d'agrégation d'isolats de protéines sériques (WPI) et à la caractérisation des fractions protéiques solubles et insolubles formées (cf. Figure *i*). Nous avons choisi d'appliquer un traitement thermique dynamique par référence aux traitements employés dans l'industrie. Les effets de la force ionique et de la température de dénaturation, seuls ou combinés, seront étudiés à partir de différentes propriétés physico-chimiques des protéines traitées thermiquement, tels que leur degré de dénaturation, la proportion d'agrégats formés ainsi que leurs tailles, leurs poids moléculaires et leurs morphologies, mais aussi à partir de l'aptitude au foisonnement et la tension de surface de solutions de protéines traitées. La stratégie d'étude suivie est résumée par la Figure *i*, de même que les techniques expérimentales mises en œuvre (calorimétrie, diffusion de la lumière, électrophorèse, microscopie, tensiométrie...). La seconde partie de l'étude sera consacrée à l'analyse de l'impact des assemblages protéiques sur les propriétés physico-chimiques des mousses produites en leur présence (cf. Figure *ii*). Cette partie sera elle-même subdivisée en deux sous-parties : la première aura pour but de résumer les résultats obtenus sur le foisonnement discontinu, étudié à l'aide d'un batteur ménager, alors que la seconde présentera les résultats sur le foisonnement continu conduit au moyen d'installations dédiées, telles qu'une unité rotor-stator et une colonne à faible entrefer, qui sont plus proches des conditions industrielles. Dans les deux cas, les résultats seront analysés en se fondant sur les

modifications de la microstructure des mousses produites et sur celles de leurs propriétés, telles que texture et stabilité dans le temps.

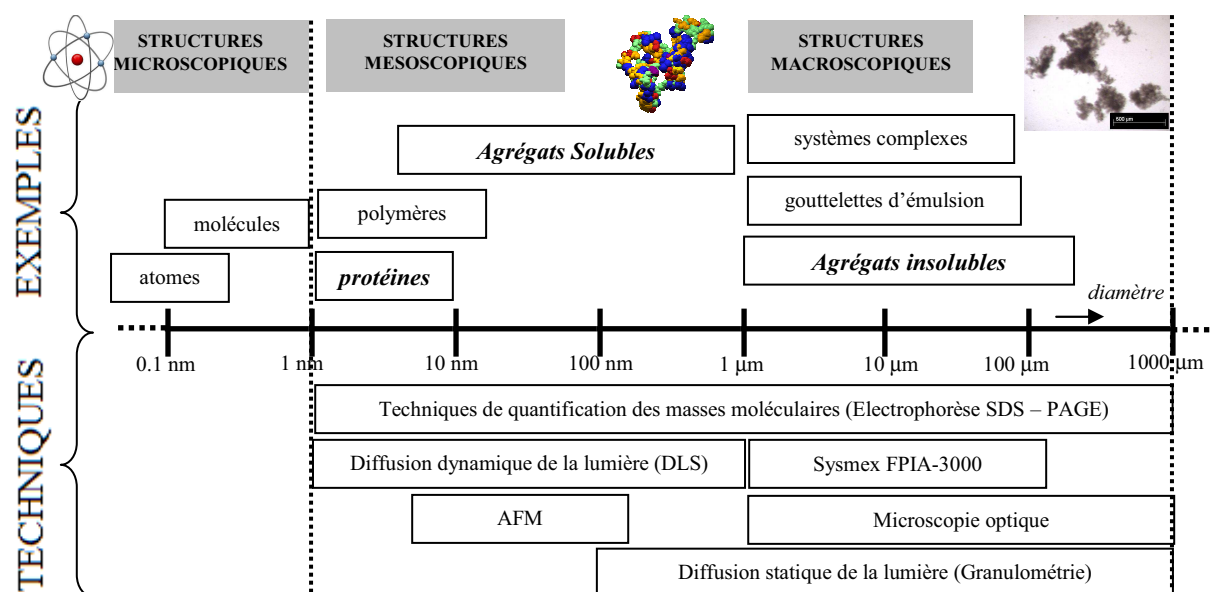


Fig. i. Échelles spatiales des structures considérées dans ce travail : la partie supérieure présente une vue d'ensemble de la classification des structures selon leur taille, alors que la partie inférieure résume les techniques de mesure mises en œuvre pour caractériser ces structures aux différentes échelles.

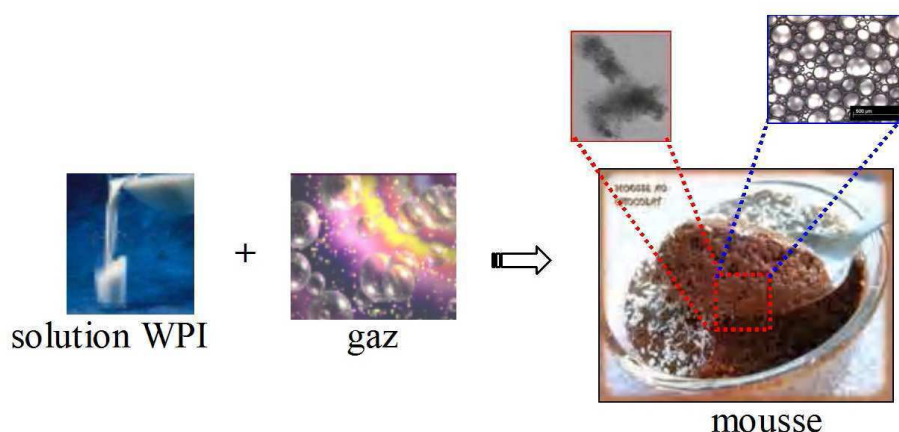


Fig. ii. Schéma simplifié de la formation de la microstructure des mousses en présence des agrégats protéiques.

Toutefois, avant de présenter les résultats de ce travail, nous débiterons ce manuscrit, comme il est de coutume, par un état de l'art fondé sur l'analyse de la littérature, suivi par une description précise des matériels et méthodes mis en jeu dans nos travaux.

Chapitre 1.

Bibliographie

I. LES PROTEINES GLOBULAIRES

I.1. GENERALITES SUR LES PROTEINES GLOBULAIRES

Les protéines sont des chaînes polypeptidiques ayant quatre niveaux de structure différents. La structure primaire correspond à l'enchaînement des acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Les protéines globulaires comportent des régions ordonnées périodiquement dans lesquelles la chaîne polypeptidique linéaire présente une structure tridimensionnelle régulière de type hélices α ou feuillets β . Ces différentes régions, dont l'organisation est maintenue par des liaisons hydrogène entre acides aminés, constituent la structure secondaire de la protéine. Notons que certaines régions protéiques ne sont pas structurées dans ce type de conformation, leurs formes irrégulières constituant des boucles. La structure tertiaire correspond à une organisation tridimensionnelle des éléments de la structure secondaire : elle résulte d'interactions essentiellement non-covalentes (forces de van der Waals, ponts hydrogène...), mais aussi parfois de ponts disulfures. La structure quaternaire se définit par l'état d'oligomérisation de la protéine, c'est-à-dire par l'état d'association des différentes sous-unités de la structure tridimensionnelle. Par exemple, la protéine peut ainsi se présenter sous forme de monomère avec une seule entité, ou bien sous formes de dimère avec l'association de deux protéines, d'oligomères, voire de polymères.

La structure dite « native » d'une protéine correspond à une conformation cœur/surface thermodynamiquement stable dans un environnement donné (pH et force ionique modérés, température ambiante). Elle résulte d'un repliement qui met en jeu de nombreuses interactions inter- et intramoléculaires. D'un point de vue thermodynamique, l'énergie libre de l'état natif est plus basse que celle de l'état déplié. La différence d'énergie libre (ΔG) entre les deux états correspond à la mesure de la stabilité conformationnelle des protéines et elle est égale à :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Equation I.1.}$$

La variation d'entropie (ΔS) peut être reliée aux changements de configuration des groupements polaires et apolaires de la protéine et des molécules d'eau. La variation d'enthalpie (ΔH) est fonction de l'énergie nécessaire à ces changements de conformation. Tout facteur affectant les interactions du système modifie la stabilité de la protéine. D'après l'Equation I.1., on voit que la température (T) affecte directement l'équilibre thermodynamique, bien qu'elle intervienne aussi dans les valeurs de ΔH et ΔS . Parmi les

autres paramètres qui régissent cette équation, le pH joue sur les interactions électrostatiques et de van der Waals et l'addition de sels solubles modifie les interactions électrostatiques et hydrophobes de la protéine. Les sels peuvent ainsi altérer la solubilité de la protéine. On distingue deux effets du sel sur la conformation:

- ✓ effet de « *salting-in* » : à faibles concentrations en sels, les répulsions électrostatiques entre les protéines diminuent du fait de l'écrantage des charges, ce qui entraîne une augmentation de solubilité de la protéine. L'efficacité des différents sels sur la stabilité des macromolécules suit la série d'Hoffmeister (Damodaran, 1989) : $F^- < SO_4^{2-} < Br^- < I^- < ClO_4^- < SCN^-$.
- ✓ effet de « *salting-out* » : au-delà d'une certaine concentration en ions, un écrantage total des répulsions électrostatiques a lieu conduisant à une précipitation de la protéine (Relkin, 1996).

Le changement de conformation des protéines entraîne des modifications à la fois de leurs propriétés physico-chimiques et technofonctionnelles, telles que leurs propriétés émulsifiantes ou moussantes, et également gélifiantes.

I.1.1. Généralités sur les protéines sériques

Les protéines sériques constituent la fraction soluble des protéines du lait. Elles sont généralement extraites du lactosérum, produit dérivé de la fabrication fromagère et/ou de la précipitation des caséines (Patel et coll., 1990). Elles sont constituées essentiellement de la β -lactoglobuline (β -Lg), de l' α -lactalbumine (α -La), de l'albumine sérique bovine (BSA) et des immunoglobulines (de Wit, 1981). Leur faible concentration dans le lactosérum a conduit au développement des techniques membranaires permettant la production des concentrés de protéines sériques (WPC) et des isolats de protéines sériques (WPI) dont les teneurs sont respectivement de 50 à 85% pour les WPC et d'au moins 90% pour les WPI. L'utilisation à l'échelle industrielle de la chromatographie d'échange d'ions a également permis la production de protéines purifiées.

I.1.1.1. La β -lactoglobuline

• Origine et utilisation:

La β -Lactoglobuline (β -Lg) est présente dans le lait des mammifères, à l'exception des primates et des rongeurs. Dans le lait de vache, sa concentration varie entre 2 et 4 g.L⁻¹ : c'est

la protéine sérique majoritaire (50%). D'un point de vue industriel, cette protéine a été largement utilisée en nutrition animale, et actuellement, elle suscite un intérêt dans le domaine alimentaire, en particulier dans les produits allégés en matière grasse ou encore dans les crèmes glacées (Cayot & Lorient, 1998).

• Structure:

La séquence primaire de la β -Lg bovine comporte 162 acides aminés pour une masse molaire calculée de 18600 g.mol^{-1} . Elle possède deux ponts disulfures et un groupement sulfhydryle libre (Cayot & Lorient, 1998).

La β -Lg contient 10% d'hélices α , 50% de feuillets β , 8% de coudes β et 35% de régions désordonnées (Qi et coll., 1997). La structure tertiaire de la β -Lg, native et complexée, a été résolue en RMN et diffraction des rayons X jusqu'à $1,8 \text{ \AA}$ par Brownlow et coll. (1997). La protéine présente une structure en calice lui conférant son appartenance à la famille des lipocalines. Le monomère, est formé par neuf feuillets β antiparallèles enroulés (Figure I.1.) dont huit forment le cœur de la molécule.

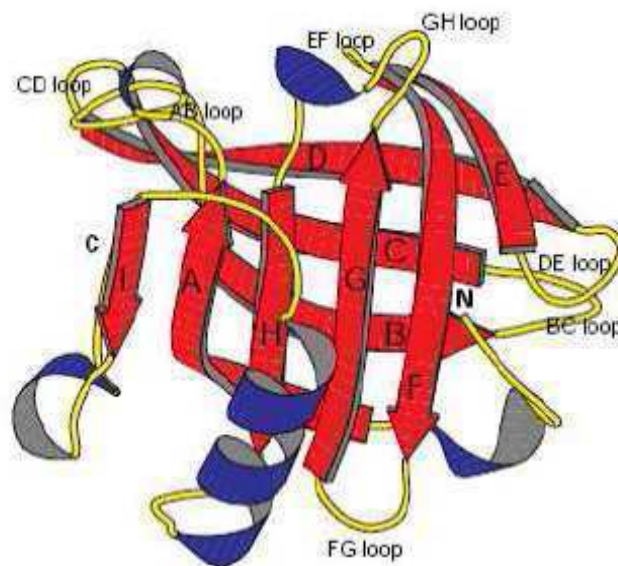


Figure I.1. Structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline selon Brownlow et coll. (1997).

La β -Lg présente une large gamme de structures quaternaires traduites par différents stades d'oligomérisation en fonction du pH du milieu. La concentration en protéines, la force ionique et la température peuvent modifier les proportions de monomères, de dimères et d'octamères. Un certain nombre de changements conformationnels réversibles de faible ampleur

accompagne l'oligomérisation de la protéine lorsque l'on augmente ou que l'on diminue le pH (Ananthanarayanan et coll., 1977) et il a été possible d'établir par RMN les différents degrés d'association des monomères de la β -Lg (Figure I.2.).

- ✓ De pH 3 à pH 7,5, à température ambiante, la β -Lg existerait vraisemblablement sous la forme d'un ensemble dimérique à l'aspect pseudo-cyclique avec un diamètre de 3,6 nm et une hauteur de 6,93 nm (Timasheff & Townend, 1964). L'implication de liaisons hydrogène entre groupements carboxyles serait à l'origine de cette structure (Creamer et coll., 1983). Cependant, à basse température (0-4°C) entre pH 3,7 et 5,1, et pour une concentration supérieure à 1,5%, le dimère se tétramérise pour former un octamère (Townend et coll., 1960).
- ✓ Si le pH augmente au delà de 7,5 ou diminue en deçà de 2, les dimères de la β -Lg se dissocient en monomères. Cette monomérisation serait due à l'augmentation de la charge nette de la protéine et à l'accroissement des forces électrostatiques répulsives qui en résulte. Il s'effectue sans changement majeur de conformation (Swaisgood, 1982).
- ✓ Pour des pH extrêmes (pH > 9), la protéine est dénaturée.

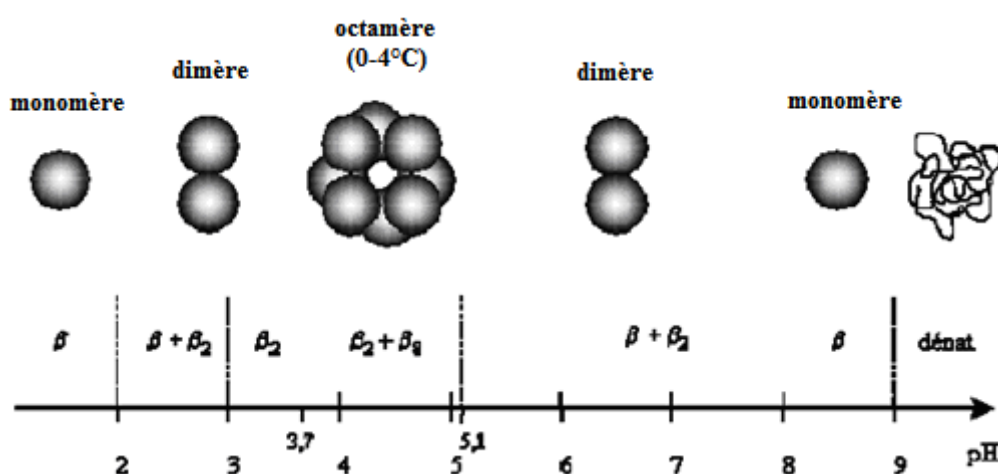


Figure I.2. États polymériques de la β -Lg en fonction du pH selon Hambling et coll. (1992).

Selon le pH, les monomères (β) s'associent par deux (β_2) ou par huit (β_8) et pour des pH extrêmes, la protéine est dénaturée (dénat.).

En outre, la dissociation dimère/monomère s'accompagne de changements conformationnels réversibles de faible ampleur (Figure I.3.). Un premier changement survient entre pH 4 et 6, appelé transition QN. Il se traduit par une augmentation du coefficient de sédimentation et est lié à la contraction de la protéine (Timasheff et coll., 1966). Entre pH 6,5 et 7,8, un deuxième changement a lieu ; il est désigné sous le nom de transition NR. Il se traduit par une

diminution du coefficient de sédimentation, liée vraisemblablement à une expansion du volume ou à une variation de forme de la protéine (Timasheff et coll., 1966). A partir de pH 8, un troisième changement conformationnel a lieu (il est noté RS), mais il est de plus faible ampleur, se traduisant par la dissociation du dimère, la valeur du coefficient de sédimentation étant en accord avec une structure monomérique. Ce changement serait suivi d'une dénaturation lente et irréversible du monomère conduisant à une agrégation.

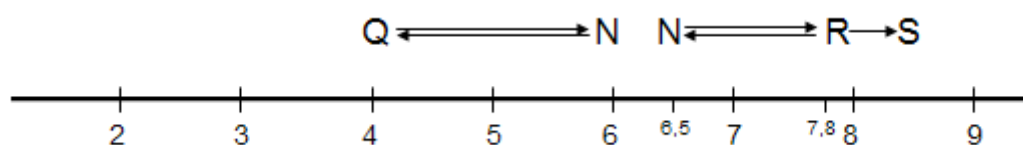


Figure I.3. Transitions conformationnelles de la β -Lg en fonction du pH d'après Hambling et coll. (1992).

• Charge:

Le point isoélectrique de la β -Lg est de 5,2. A pH 7, la charge nette de la protéine a été évaluée à 7,8 (Renard & Lefebvre, 1992).

I.1.1.2. L' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine (α -La), métallo-protéine contenant un atome de calcium (Hiraoka et coll., 1980), participe à l'activité de la lactosynthétase : elle a des structures primaire et secondaire connues et présente une faible tendance à la polymérisation. L' α -La est la deuxième protéine du lactosérum (22%) et elle est constituée de 123 acides aminés pour une masse moléculaire de 14200 g.mol^{-1} . La dénaturation irréversible est obtenue à plus haute température que pour la β -lactoglobuline car l' α -lactalbumine possède 4 ponts disulfures et aucun groupement sulfhydryle libre. Si un groupe $-\text{SH}$ libre d'une autre molécule (β -Lg, par exemple) réagit avec un pont $\text{S}-\text{S}$, il y a association entre les protéines (complexe mixte β -Lg/ α -La). La stabilité thermique de l' α -lactalbumine peut aussi être attribuée à la forme cyclique de la molécule (Cheftel & Lorient, 1982).

I.1.1.3. L'albumine sérique bovine

L'albumine sérique bovine (BSA) représente 5% des protéines sériques. Elle est identique à l'albumine isolée dans le plasma sanguin. Elle comprend 582 acides aminés pour

une masse moléculaire d'environ 66000 g.mol^{-1} (Peters, 1985). Elle est stabilisée par 17 ponts disulfures intramoléculaires et contient un groupe sulfhydryle libre. Bien que sa structure secondaire soit principalement constituée d'hélices α ($\sim 67\%$), la BSA a une structure très flexible et change rapidement de conformation. Elle se présente sous la forme d'un ellipsoïde prolata de demi-axes de 20 et 70 Å de long pour un rayon de giration de 33.8 Å (Lefebvre et coll., 1998).

I.1.1.4. Les immunoglobulines

Bien que possédant des ponts disulfures, la dénaturation des *immunoglobulines* (Ig) n'est pas affectée par les réactifs possédant un ou des groupes $-\text{SH}$. Dans le lait froid, elles s'associent aux globules gras et les agrégats obtenus remontent en surface : cette propriété disparaît au cours de la dénaturation (Cheftel & Lorient, 1982).

I.1.2. Dénaturation et agrégation des protéines sériques

Sous l'effet de traitements thermiques ou thermomécaniques, les protéines sériques se dénaturent, puis s'agrègent (Clark, 1998 ; Clark et coll., 2001 ; Gosal et coll., 2000). L'agrégation thermique des protéines sériques a fait l'objet d'un grand nombre d'études (par exemple, de la Fuente et coll., 2002) et en particulier l'agrégation de la β -Lg qui a souvent été utilisée comme protéine modèle représentative (Aymard et coll., 1996 ; Verheul et coll., 1998).

La chaleur est l'un des principaux agents physiques induisant la dénaturation des protéines. La dénaturation d'une protéine native se définit comme un changement dans sa structure tridimensionnelle, qu'il concerne le niveau secondaire, tertiaire ou quaternaire. La structure des protéines peut être affectée de façon réversible ou irréversible. Une dénaturation irréversible se déroule en deux étapes. La première est réversible et consiste en une rupture des liaisons intramoléculaires de l'état natif de la protéine. Cela correspond à la disparition d'une partie de la structure tridimensionnelle de la protéine. La seconde étape est le déplissement de la protéine qui mène à un ou plusieurs états dénaturés (Galani & Owusu Apenten, 1996).

Un traitement thermique doux (par exemple à près de 60°C) permet le déplissement des protéines sériques et une exposition des groupements $-\text{SH}$, alors qu'un traitement thermique supérieur à 65°C mène à la dénaturation et à l'agrégation des protéines du

lactosérum. L'ordre de dénaturation des différentes protéines sériques est le suivant: immunoglobuline > sérum albumine bovine > β -lactoglobuline > α -lactalbumine (Morr & Ha, 1993). La vitesse de dénaturation est également influencée par le pH, l'environnement minéral et la concentration en solides.

Les protéines sériques sont particulièrement sensibles à la dénaturation thermique et aux interactions entre les ions Ca^{2+} et les protéines. Elles sont susceptibles de s'agréger et de précipiter à cause des interactions électrostatiques à des pH voisins de 4,5 et 4,6. A ces pH, donc près du point isoélectrique (pI) des protéines sériques, la β -Lg et l' α -La dénaturées thermiquement forment des agrégats insolubles par des liaisons électrostatiques, des interactions hydrophobes et des forces de Van der Waals. À son pI, une protéine a une charge nette égale à zéro : elle comporte des groupements chargés négativement et positivement qui peuvent se lier aux groupements des autres protéines et ainsi s'agréger et précipiter (Galani & Owusu Apenten, 1996). Lorsque le pH s'éloigne du pI, il y a une augmentation des charges répulsives suivie d'un déplissement de la protéine. Il n'y a donc pas d'agrégation car le déplissement de la protéine est favorisé grâce aux répulsions électrostatiques (Galani & Owusu Apenten, 1996).

Le dernier facteur influençant la vitesse de dénaturation est la concentration en matières sèches. Nielsen et coll. (1973) ont étudié ce facteur et rapporté que la concentration en solides totaux, qui sont principalement constituées de lactose, affecte fortement la vitesse relative de dénaturation de chacune des protéines sériques prises individuellement dans un lactosérum doux concentré sous vide. Le pourcentage de protéines dénaturées en chauffant le lactosérum pendant 20 minutes à 80°C baisse de 80 à 40% lorsque les solides totaux passent de 9 à 44%. Ces auteurs suggèrent que les protéines de lactosérum sont plus sensibles à la chaleur lorsque la concentration en lactose est faible.

Globalement, les conditions d'agrégation des protéines sériques sont proches de celles de la β -Lg seule ; nous ne détaillerons donc par la suite que les mécanismes relatifs à l'agrégation de cette protéine.

I.1.2.1. Dénaturation et agrégation de la β -lactoglobuline par la chaleur

Lors du chauffage, le mécanisme de dénaturation de la β -lactoglobuline débute par la dissociation de la structure dimérique de la molécule (dans les conditions de pH et de concentration du lait). La rupture de la structure quaternaire et les modifications des structures tertiaire et secondaire de la β -lactoglobuline conduisent à deux grands événements :

- ✓ l'exposition du groupement sulfhydryle de la protéine qui entraîne des échanges de ponts disulfures au sein même de la molécule ou avec une protéine voisine : à partir d'une valeur de pH de 6, le groupement sulfhydryle dont le pK est voisin de 9,38 (Kella & Kinsella, 1988) se trouve sous la forme thiolate ($R-S^-$, forme nucléophile) en quantité suffisante pour pouvoir être responsable d'attaques nucléophiles sur les ponts disulfures présents dans la structure de la β -lactoglobuline. Il s'établit donc des liaisons interprotéiques par échange de ponts disulfures selon un mécanisme pH-dépendant (Kella & Kinsella, 1988 ; Cayot & Lorient, 1998 ; Havea et coll., 1998). Ce mécanisme peut même avoir lieu sans traitement thermique, en présence d'urée, comme le rapportent Katsuka et coll. (1997). Ceux-ci ont alors observé la formation de polymères protéiques issus d'échanges de ponts disulfures, sans traitement thermique, par exposition de groupements sulfhydryles.
- ✓ le déplissement de la protéine qui conduit à une augmentation de l'exposition de ses zones hydrophobes internes et, consécutivement, à l'association de plusieurs zones hydrophobes entre elles (soit d'une même protéine, soit de deux unités différentes). Le déplissement thermo-induit de la β -lactoglobuline et l'exposition de zones hydrophobes permettent de former des agrégats protéiques par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques (Hines & Foegeding, 1993). Ceci a été démontré par l'utilisation de N-éthylmaléimide dont le rôle est de bloquer les groupements sulfhydryles. On a constaté que malgré l'inactivation des groupements sulfhydryles, l'agrégation a lieu sans échange de ponts disulfures (Hoffmann & Vanmil, 1997). Il est important de signaler, à ce sujet, que l'étendue et la vitesse de déplissement de la protéine sont directement liées au couple temps/température de traitement.

Ces deux événements vont finalement aboutir à la formation d'agrégats. En conclusion, la thermo-dénaturation et l'agrégation de la protéine sont directement influencées par différents paramètres tels que la force ionique, le pH, la température de traitement et la concentration protéique. Nous allons maintenant détailler le rôle de la force ionique et du traitement thermique sur la formation des agrégats.

I.1.2.2. Effet du chlorure de sodium sur la dénaturation et l'agrégation de la β -Lg

La force ionique joue un rôle important sur la stabilité thermique de la β -Lg. En général tous les sels, au dessus d'une certaine concentration, favorisent l'agrégation en accroissant l'influence des interactions hydrophobes par une diminution des répulsions

électrostatiques (Cayot & Lorient, 1998). À des pH acides, une augmentation de la force ionique (0,5 – 1,0 M, selon le type de sel) prévient la dénaturation par un effet stabilisant (*salting-in*) qui stabilise la conformation dimérique (Renard et coll., 1998), mais à des concentrations trop élevées (e.g. > 2 M) l'agrégation est favorisée (*salting-out*) (Verheul et coll., 1998 ; Cayot & Lorient, 1998). Finalement, il a été démontré qu'à des pH supérieurs au pI, les anions peuvent interagir et aussi se fixer aux groupements carboxyliques de la protéine et affecter la réactivité du groupement thiol (Jeyarajah & Allen, 1994).

Dans le cadre de notre étude, nous avons accordé une attention particulière à l'effet du chlorure de sodium sur la dénaturation et l'agrégation des WPI ; celui-ci est présenté plus en détail dans le paragraphe suivant.

Le chlorure de sodium (NaCl) est un ingrédient largement utilisé dans l'industrie alimentaire. Deux effets opposés sur la dénaturation et l'agrégation de la β -lactoglobuline lui ont été attribués :

- ✓ un effet protecteur du NaCl vis-à-vis de la dénaturation thermo-induite de la protéine a été rapporté par Xiong et coll. (1993), Renard et coll. (1998) et Verheul et coll. (1998). Renard et coll. (1998) expliquent la capacité du NaCl à stabiliser la β -lactoglobuline par l'aptitude de ces ions à favoriser la formation de dimères de la protéine : la première étape de la dénaturation étant la dissociation des dimères protéiques en monomères, le NaCl ralentit cette étape, d'où cet effet stabilisateur.
- ✓ toutefois, il semblerait que le NaCl entraîne également l'augmentation de la taille des agrégats formés : il s'agirait d'une augmentation de la taille des agrégats constante dans le temps et dans les conditions de la manipulation. Il est aussi possible que le NaCl augmente la solubilité des protéines dans la solution, ce qui provoquerait une augmentation de leur déplissement d'où une agrégation facilitée. Dans le même ordre d'idée, Aymard et coll. (1996a) constatent qu'à pH 2, une augmentation de la force ionique par addition de NaCl de 0 à 30 mM permet d'augmenter le taux de branchement et la flexibilité des agrégats linéaires formés à ce pH.

En conclusion, pour expliquer l'effet du NaCl sur le mécanisme général d'agrégation de la protéine, la majorité des auteurs semblent en accord pour affirmer qu'il existe une concentration optimale de NaCl permettant d'obtenir les meilleures conditions d'agrégation possibles et que cette concentration dépend fortement des autres propriétés du milieu et des conditions opératoires (pH, concentration en β -lactoglobuline, température et durée de traitement...) (Gaucheron, 2004).

I.1.2.3. Traitements thermiques à pH neutre

Les étapes initiales de la dénaturation induite par la chaleur à pH neutre impliquent la dissociation des dimères de β -Lg native en monomères natifs ou bien dénaturés à une température critique d'environ 60°C, accompagnée par l'exposition des groupements sulphydryles et des échanges de ponts disulfures (Croguennec et coll., 2003; Iametti et coll., 1996). A ce moment, la formation irréversible des polymères peut débuter. Cairolì, Iametti, & Bonomi (1994) ont démontré que les liaisons hydrophobes sont également impliquées dans le mécanisme d'agrégation, selon la température du traitement thermique, et qu'elles conduisent à la formation de plus gros agrégats.

Chauffée à 80°C à pH 6,8-7,5, la β -Lg subit une dénaturation très partielle, également sans agrégation et sans perte de solubilité. Il semble que le groupement sulfhydryle, démasqué et activé au-dessus de pH 6,8 provoque un réarrangement de ponts disulfures intramoléculaires avec stabilisation thermique de la molécule. L'analyse enthalpique différentielle (DSC) montre en effet que le pic endothermique à 80°C est très réduit et le second pic endothermique à 140°C (qui correspond à la dénaturation des structures résiduelles) est très important (de Wit & Klarenbeek, 1981) (Figure I.4.).

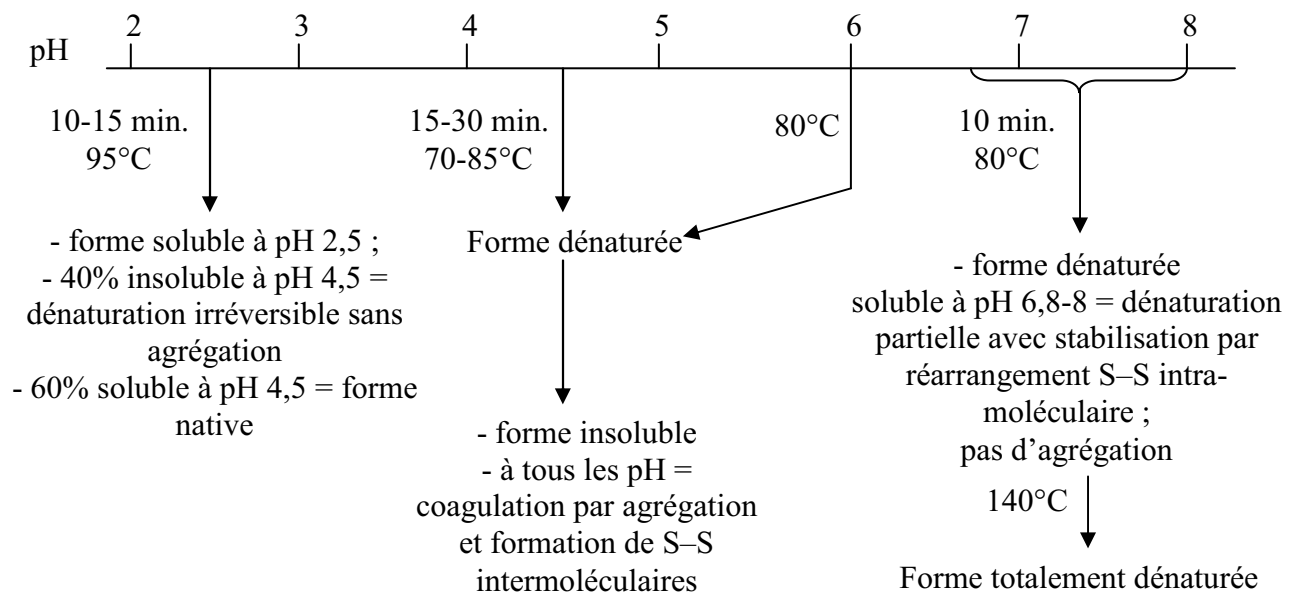


Figure I.4. Dénaturation thermique de la β -lactoglobuline (de Wit & Klarenbeek, 1981).

Parallèlement, lorsqu'un lactosérum « clarifié » et concentré à 3% de protéines par évaporation est chauffé à 80-85°C pendant 10 à 15 min à pH 6,8 ou 7,5, plus de 70% de l'azote reste soluble, et certaines propriétés fonctionnelles, en particulier le pouvoir moussant, semblent améliorées (*de Wit & Hontelez-Backx, 1981 ; Nizo, 1979*). Les effets de tels traitements thermiques à pH neutre méritent d'être approfondis et interprétés à la lumière des études physico-chimiques sur la dénaturation protéique à l'échelle moléculaire. Le déplissement des structures globulaires compactes peut en effet démasquer des zones hydrophobes et conférer un caractère plus amphipolaire à la molécule, ce qui devrait améliorer ses propriétés d'agent surfactant (*Cheftel & Lorient, 1982*).

I.1.2.4. Mécanismes d'agrégation de la β -Lg

Le comportement des protéines sériques à l'agrégation est donné par la principale protéine dans le lactosérum à savoir la β -Lg. Plusieurs modèles d'agrégation de la β -Lg ont été proposés dont le premier était celui de Roefs et de Kruif (*Roefs & de Kruif, 1994*).

L'existence de deux étapes dans le processus d'agrégation de la β -Lg à pH 7 et l'importance de l'échange $-SH/S-S$ ont été confirmées (*Durand et coll., 2002 ; Aymard et coll., 1996 ; le Bon et coll., 1999 ; Gimel et coll., 1994 ; Baussay et coll., 2004*) et un mécanisme d'agrégation en deux étapes sur une plus large gamme de force ionique et de température a été proposé (Figure I.5.) :

- ✓ Étape 1 : Sous l'effet de la température, l'équilibre dimère/monomère est déplacé vers le monomère qui se dénature. Les monomères dénaturés s'associent irréversiblement en unités stables appelées pré-agrégats ou agrégats primaires, constitués d'environ 100 monomères. Les agrégats primaires ont un rayon hydrodynamique R_h compris entre 15 et 20 nm et une masse molaire en poids M_w de l'ordre de $1,6.10^6$ g/mol, indépendamment de la température, de la force ionique et de la concentration.
- ✓ Étape 2 : Si la concentration en protéines et la force ionique sont suffisamment élevées, les agrégats primaires s'associent pour former des agrégats fractals dont la taille augmente avec le temps de chauffage.

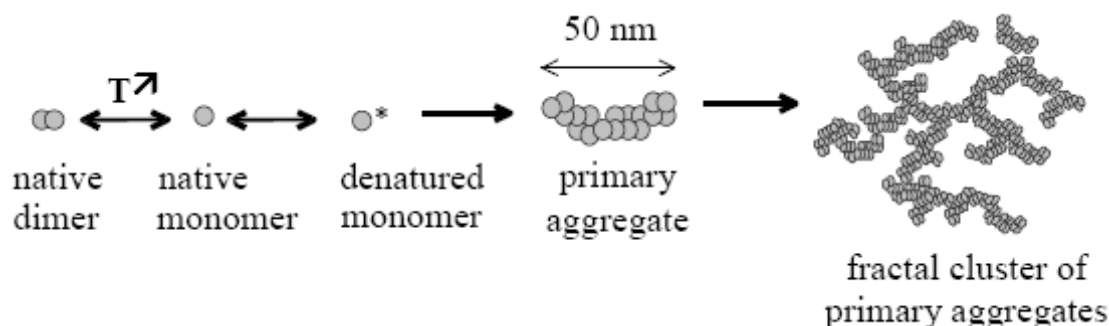


Figure I.5. Modèle d'agrégation thermique en deux étapes de la β -Lg à pH 7 (Aymard et coll., 1996).

I.1.2.5. Formation et morphologie des agrégats solubles

Les agrégats solubles qualifiés de polymères sont obtenus après avoir appliqué un traitement thermique à une dispersion protéique dans un environnement faiblement minéralisé à pH neutre ou alcalin. En effet, lorsque le chauffage est effectué à des pH s'éloignant du pI de la β -lactoglobuline et à force ionique faible, la précipitation et la gélification ne sont pas observées. Ce phénomène est dû aux répulsions de charge qui limitent la réaction d'agrégation (malgré un déplissement complet des protéines) et stabilisent les polymères. Des dispersions protéiques à des concentrations de 8-10% chauffées à des pH supérieurs à 6,5 avec une force ionique inférieure à 20 mM ne s'agrègent pas (Britten, 1998). L'ajout de calcium favorise l'association entre les protéines et la longueur de chaîne des polymères solubles. Les polymères solubles obtenus après un chauffage de 15 minutes à 95°C font apparaître plusieurs caractéristiques spécifiques. Tout d'abord, la dispersion de polymères solubles est non-sédimentable (20000g pour 15 minutes) et ce, malgré une dénaturation complète des protéines. En effet, 95% des protéines demeurent dans le surnageant après une centrifugation. Les polymères solubles possèdent une longueur et une largeur moyennes respectivement de 90 et 12 nm (soit un facteur de forme d'environ 7,5). La viscosité intrinsèque moyenne d'une dispersion de polymères solubles est de 13,5 mL/g, ce qui correspond à une hydratation de 0,4 mL/g de protéine. Les ponts disulfures jouent un rôle clé dans la polymérisation des protéines et pourraient être impliqués dans la formation des gels, lorsque la dispersion de polymères solubles est acidifiée (Britten, 1998).

En effet, Weijers (2005) a clairement expliqué (Figure I.6.) le processus de formation des agrégats protéiques solubles. Bushell et coll., (2002) et Lin et coll., (1990) ont rapporté qu'en fait, une caractéristique de l'agrégation est l'augmentation exponentielle de la taille

moyenne des amas dans le temps. La cinétique de croissance ainsi que la distribution de masse des agrégats auront, à leur tour, une influence sur la structure des agrégats formés. Ainsi, à des vitesses d'agrégation élevées, les amas formés seront diffus, alors que lorsque les agrégats se forment lentement ils seront plus denses, du fait que les particules peuvent s'arranger et s'interpénétrer davantage à cause de leur faible vitesse de réaction. Ainsi, les deux régimes aboutissent à des structures internes différentes.

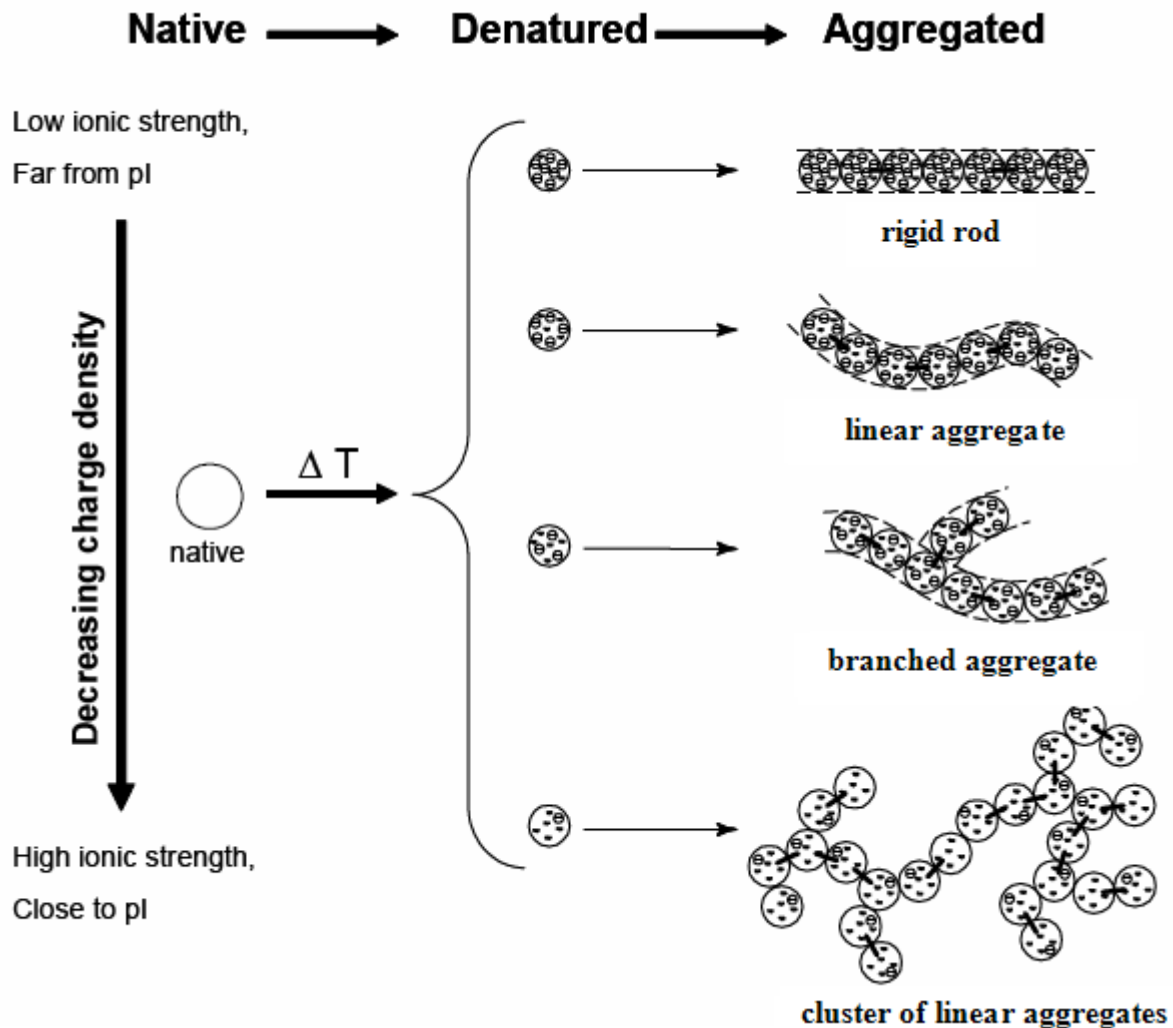


Figure I.6. Modèle de dénaturation thermique et de formation des agrégats. Les zones foncées (⚡) indiquent les régions hydrophobes exposées suite au traitement thermique, les signes moins (⊖) et les tirets (—) indiquent respectivement la charge nette calculée à pH 7 et les ponts disulfures (Weijers et coll., 2004).

Récemment, plusieurs travaux (Ikeda & Morris, 2002 ; Mahmoudi et coll., 2006 ; Mahmoudi, 2007 ; Gracia-Juliá et coll., 2008 ; Schmitt et coll., 2007) se sont intéressés à

l'effet du pH, de la force ionique, des hautes pressions et de la température sur la morphologie des agrégats solubles de protéines sériques. Par exemple, *Mahmoudi (2007)* ont analysé par cryo-TEM la structure des agrégats de protéines sériques obtenus en modifiant la force ionique par un ajout de 0,003 M à 0,1 M NaCl ainsi que par un traitement thermique à des températures de 80°C, 100°C et 120°C (Figure I.7.). Concernant la solution de protéines sériques à 0,1 M NaCl, un phénomène d'auto-assemblage des agrégats a été observé quand la solution a été traitée thermiquement à des températures supérieures ou égales à 100°C. En revanche, à des conditions de température plus faibles (moins que 80°C), aucun type de réarrangement n'a été induit. Les agrégats de forme sphérique générés par chauffage à 100°C et 120°C sont associés sous forme de grappes où chaque agrégat de forme sphérique est lié à d'autres par des liaisons de type ionique favorisées par l'addition de NaCl.

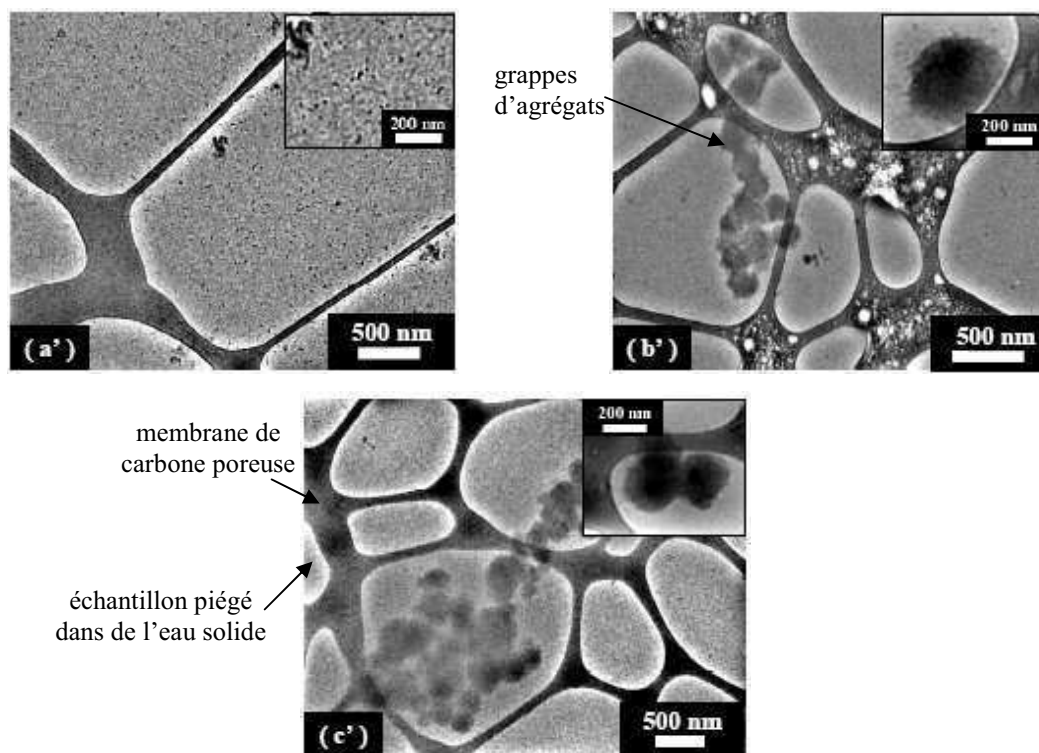


Figure I.7. Images de cryo-TEM des agrégats de protéines sériques obtenus à partir d'une solution à 0,1 M NaCl pour différentes conditions de chauffage: (a') 80°C; (b') 100°C; (c') 120°C (*Mahmoudi, 2007*).

Schmitt et coll. (2007) ont montré que la combinaison pH/addition de NaCl dans le cas des solutions de protéines sériques chauffées à 85°C pendant 15 minutes permet de générer des agrégats solubles qui présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques et des morphologies qui ne peuvent pas être obtenues dans le cas d'un simple ajustement du seul pH. Ces mêmes auteurs ont observé que les agrégats générés à un pH supérieur à 6,6 en présence

de sel présentent une structure fibrillaire, tandis que les agrégats obtenus en l'absence du sel sont moins denses (Figure I.8.). En revanche, à un pH inférieur à 6,6, des agrégats solubles compacts de forme sphérique sont formés, mais les solutions protéiques n'ont montré ni des capacités moussantes, ni des propriétés stabilisantes améliorées, peut-être en raison de la grande taille et de la structure compacte des agrégats. Une estimation de la taille des agrégats solubles générés suite à un chauffage a été reportée par *Schmitt et coll. (2007)* qui ont montré qu'en présence de 5 mM NaCl et à pH 6, le « diamètre apparent » des plus gros agrégats sphériques est d'environ 140 nm. En augmentant le pH de solutions protéiques à 6,6 et la force ionique à 70 mM NaCl, les mêmes auteurs ont observé la formation d'agrégats vermiciformes avec une longueur d'environ 50-60 nm. En revanche, à pH 7 sans sel ou en présence de 120 mM NaCl, des objets fibrillaires avec une longueur de 50 nm ont été observés.

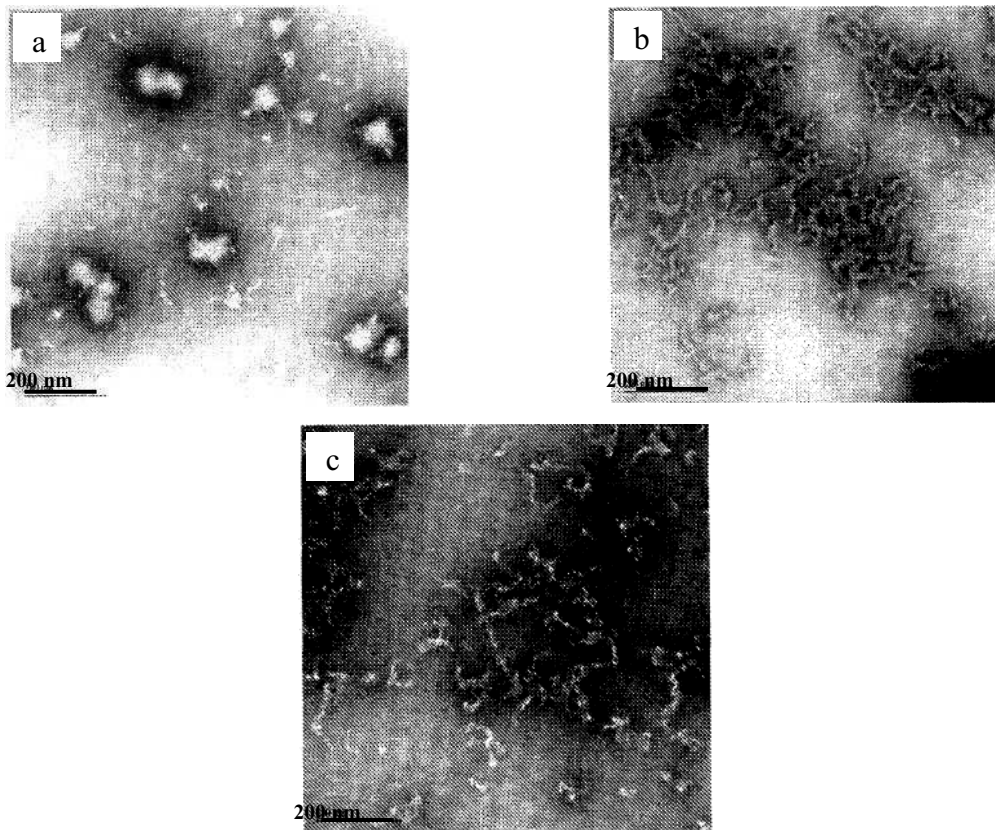


Figure I.8. Images de TEM de protéines sériques issues d'une dispersion à 1% (w/w) chauffée à 85°C pendant 15 min à un pH compris entre 6 et 7 en présence de NaCl : pH 6 – 5 mM (a), pH 6,6 – 70 mM (b), pH 7 – 120 mM (c). L'échelle est de 200 nm (*Schmitt et coll., 2007*).

Mahmoudi (2007) et *Gràcia-Julià et coll. (2008)* ont étudié l'homogénéité des films protéiques à l'aide de la microscopie à force atomique (AFM) (Figure I.9.). *Gràcia-Julià et*

coll. (2008) ont montré que dans le cas des protéines natives traitées par homogénéisation hautes pressions à 200 MPa, les particules sont régulièrement arrangées sous forme de petits agrégats de 10–40 nm et sont distribuées de façon homogène sur le support de mica hydrophile. Après un traitement à une pression supérieure à 250 MPa, les particules sont en revanche concentrées dans des amas de taille comprise entre 60 et 170 nm.

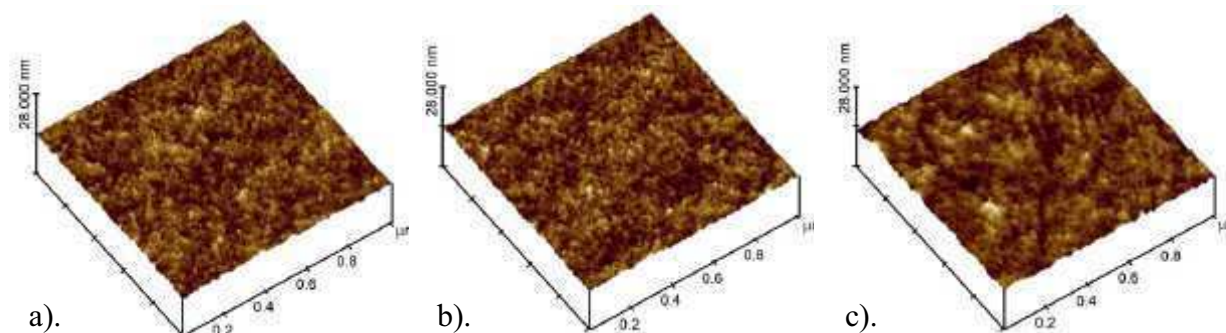


Figure I.9. Images par AFM des protéines sériques issues de solutions contenant 10% (w/w) de protéines à pH 6,5 : natives (a) ; traitées à 200 MPa (b) ; traitées à 250 MPa (c) (*Gràcia-Julià et coll., 2008*).

Il faut aussi noter que dans les travaux de la littérature (*Mahmoudi, 2007*), il a été démontré que la détermination de la taille et de la morphologie des agrégats présente une importance toute particulière : elle permet en effet de mieux comprendre l'impact de la structure et de la cohésion des agrégats sur les propriétés interfaciales des protéines sériques. Ainsi, la forme des agrégats (sphériques ou fractals) semble jouer un rôle clé sur leurs propriétés d'étalement, ainsi que sur l'élasticité du film interfacial.

I.1.2.6. Effet du traitement mécanique sur l'agrégation des protéines

Un traitement mécanique appliqué à une solution protéique en absence de tout autre traitement (chauffage ou une modification des conditions de milieu) n'entraîne généralement pas de dénaturation, ni d'agrégation des protéines. Cependant, *Sanchez & Paquin (1997)*, *Considine et coll., (2007)* et *Bouaouina et coll., (2006)* ont rapporté une dénaturation et une agrégation partielle des protéines lorsque la vitesse de cisaillement appliquée excède une valeur critique.

Lorsqu'un traitement mécanique est appliqué simultanément ou postérieurement à un traitement thermique qui diminue la solubilité des protéines, il va favoriser leur agrégation. En effet, lors d'un traitement thermique sans agitation, la fréquence des collisions entre les objets

n'est liée qu'au mouvement brownien et au nombre d'objets. Au contraire, le cisaillement induit une augmentation de la fréquence des collisions, conduisant ainsi à une agrégation plus rapide (McClements, 1999). Pour les protéines de lactosérum, ce mécanisme a déjà été observé par Renard et coll. (2002) à pH 7 et par Hill et coll. (2006) à pH 2. Dans les deux cas, un traitement thermique suivi d'un traitement mécanique à cisaillement constant appliqué à froid dans un rhéomètre conduit à la formation d'agrégats de grande taille ($> 1 \mu\text{m}$) à pH neutre et à la formation de fibrilles à pH acide.

La plupart des travaux portant sur l'influence du cisaillement sur l'agrégation des protéines ont été réalisés dans le cadre du développement de microparticules protéiques dans le but de remplacer la matière grasse émulsionnée dans les aliments. La fabrication de ces microparticules met en œuvre des traitements thermiques à haute température sur des solutions concentrées de protéines (lactosérum, blanc d'œuf, protéines de poissons, soja...). Dans ces conditions, la dénaturation très rapide des protéines, liée aux fortes températures, conduirait à la formation d'un gel mais l'application d'un fort cisaillement ($5000\text{-}40000 \text{ s}^{-1}$) empêche la formation de celui-ci et limite la taille des agrégats par érosion lors des collisions entre eux (Sanchez & Paquin, 1997). Le traitement mécanique peut être appliqué simultanément au traitement thermique dans un échangeur à surface raclée ou une extrudeuse, ou bien après refroidissement par passage dans un homogénéisateur hautes pressions (Sanchez et coll., 1997). Dans ces procédés, l'effet recherché du cisaillement n'est pas une accélération de l'agrégation, mais plutôt une limitation de la taille des agrégats. Il existerait donc deux régimes de formation des agrégats: les cisaillements faibles à moyens favorisent la formation d'agrégats, alors que les cisaillements plus importants limiteraient leur taille.

I.1.3. Impact de la dénaturation et de l'agrégation des solutions protéiques sur leurs propriétés interfaciales

Le mécanisme d'adsorption des protéines globulaires à l'interface air-liquide a été largement étudié car il détermine leurs propriétés interfaciales. Selon la littérature (MacRitchie, 1990; Miller et coll., 2000), la cinétique d'adsorption des protéines à l'origine de la formation des mousses protéiques peut être décomposée en trois – voire quatre – phases successives (Figure I.10.) :

(i) *une première étape d'induction ou « lag period »* : La présence d'une telle période peut être reliée au temps requis pour l'adsorption d'une quantité suffisante de monomères protéiques afin que les interactions entre molécules soient discernables (Miller et coll., 2000).

(ii) *la diffusion des protéines de la solution vers l'interface* : Cette étape est caractérisée par la diffusion des protéines vers l'interface et l'initiation des changements conformationnels des protéines adsorbées. Elle dépend du mode de transport des protéines et donc du traitement mécanique appliqué.

(iii) *l'adsorption comprenant les changements de conformation et le compactage des protéines adsorbées* : L'interface continue à se recouvrir de protéines, causant la diminution de la tension interfaciale. Ce sont les phénomènes de changements conformationnels et de dénaturation des protéines adsorbées qui deviennent alors prépondérants vis-à-vis de la diffusion et de l'adsorption initiales et qui permettent la diminution de la tension interfaciale (Beverung et coll., 1999). Lorsque l'interface est déjà recouverte, une barrière énergétique se développe, s'opposant à l'approche et à l'adsorption de nouvelles molécules (De Feijter et coll., 1987).

(iv) *le réarrangement irréversible du film protéique avec la formation de multicouches et la gélification interfaciale* : On atteint un état du film où plus aucune introduction de nouvelles protéines n'est possible. Les molécules ancrées à l'interface subissent alors des réarrangements conformationnels afin de minimiser l'énergie libre de surface ; les phénomènes de recouvrement latéral et d'enchevêtrement sont initiés. La barrière énergétique développée par les protéines adsorbées et s'opposant aux réarrangements conformationnels des autres molécules est alors reliée à l'incompressibilité plus ou moins forte du film interfacial. Des multicouches sont construites au sein même de la phase aqueuse, les protéines s'agréant entre elles et formant des branches. Ces branches se connectent alors en de nombreux points, initiant l'agrégation des protéines plus éloignées du film, alors que les monomères protéiques adsorbés, ont juste changé de conformation. Il en ressort l'élaboration d'une structure amorphe en réseau de type « gel » à l'interface (Beverung et coll., 1999).

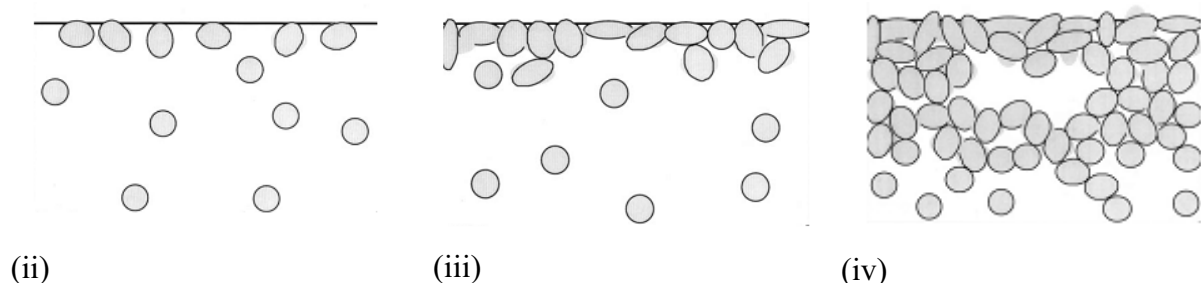


Figure I.10. Représentation schématisée du mécanisme d'adsorption des protéines globulaires selon Beverung et coll. (1999). Les protéines natives sont représentées par des cercles et les ellipses indiquent des changements conformationnels.

Selon la littérature (*Damodaran, 2005*), la dénaturation et l'agrégation modifient la structure des protéines sériques en solution et par conséquent leurs propriétés interfaciales. Dans le cas des protéines d'œuf, *Kato et coll. (1983)* ont rapporté qu'une dénaturation partielle des protéines globulaires avant utilisation améliore leur capacité émulsifiante et moussante grâce à l'augmentation de la flexibilité moléculaire et de l'hydrophobicité de surface des protéines. *Zhu & Damodaran (1994)* ont montré que l'amélioration des propriétés moussantes des solutions de WPI est due à des changements conformationnels notamment à des changements dans la structure secondaire, mais aussi et surtout au rapport des concentrations de monomères et d'agrégats protéiques. Par ailleurs, ces auteurs ont démontré que les monomères contribuent plutôt au moussage, alors que les agrégats jouent un rôle clef en favorisant la stabilité des mousses. Il semblerait que les agrégats protéiques contribuent principalement à la stabilité de la mousse parce que les films formés par les monomères ne semblent pas fournir les propriétés viscoélastiques nécessaires à la stabilisation des mousses. Toutefois, le mécanisme par lequel les agrégats contribuent à la stabilisation de la mousse n'est pas totalement élucidé. Différentes hypothèses ont été proposées:

- ✓ si les agrégats protéiques peuvent s'adsorber à l'interface, ils augmenteront la viscoélasticité de l'interface et amélioreront ainsi la stabilité de la mousse (*Davis & Foegeding, 2004*) ;
- ✓ si les agrégats ne peuvent pas s'adsorber à l'interface, ils resteront dans la phase aqueuse. Dans ce cas, les agrégats peuvent être confinés dans les films interfaciaux de la mousse et conduire à la formation d'un gel, ce qui réduit en conséquence le drainage (*Saint-Jalmes et coll., 2005*).

L'effet des traitements thermiques sur les propriétés d'étalement et d'adsorption des protéines sériques et sur les propriétés rhéologiques des films dépend des conditions de chauffage. *Mitchell et coll. (1970)* ont montré grâce à un traceur radioactif, que les protéines sériques préalablement chauffées à 85°C/20 min à une concentration de 0,03% s'étalent d'une manière très similaire aux protéines natives. En revanche, *Mahmoudi (2007)* a montré que les agrégats fractals s'étalent moins lorsque leur taille augmente en raison de leur rigidité et leur ramification. En présence de fortes répulsions électrostatiques, les branches des agrégats se repoussent, ce qui augmente la rigidité et diminue l'étalement. Ceci s'explique par le fait que les propriétés d'étalement des agrégats dépendent de leur cohésion et de leur flexibilité.

Rullier, Axelos & Novales (2008) ont étudié l'aptitude des protéines non-agrégées et également des agrégats à s'adsorber aux interfaces air/eau. Ils ont observé que la vitesse d'adsorption des agrégats diminue avec leur taille. Trois classes d'agrégats présentant deux comportements d'adsorption ont été distinguées : (i) pour les plus gros agrégats, aucune baisse de la valeur de la tension de surface n'a été observée; (ii) pour les agrégats de taille intermédiaire avec R_h entre 71 et 117 nm; et (iii) les petits agrégats (R_h 35 nm), pendant les premières 10 s, une diminution de la tension de surface semblable à la celle des protéines non-agrégées a été enregistrée. *Bouaouina (2005)* a rapporté une chute importante (de plus de 50%) du temps caractéristique de diffusion de la solution protéique native suite à un traitement d'homogénéisation à 300 MPa. Cette diminution pourrait correspondre à la réduction de la taille des agrégats protéiques présents dans la solution native par traitement hautes pressions. Cette action sur les « gros agrégats » favorise d'une part la mobilité de ces petites entités dans la phase continue et d'autre part l'accessibilité aux zones plus hydrophobes. Ce même auteur a également observé que lorsqu'on élimine les « gros agrégats » dans la solution native par filtration à 0,45 μm , la cinétique d'adsorption devient plus rapide. Par conséquent, cet auteur a conclu que puisque la concentration en petits agrégats était la même après filtration à 0,45 μm , l'amélioration de la cinétique d'adsorption serait donc due au fait que les « gros agrégats » empêchent les plus petits à s'adsorber à l'interface air-eau.

II. MOUSSES DE *PROTEINES SERIQUES*

Dans ce sous-chapitre, nous nous intéresserons uniquement à la formation des mousses alimentaires. Dans ce but, nous introduirons dans un premier temps les aspects fondamentaux liés à la fabrication et aux aspects physico-chimiques des mousses ; nous discuterons ensuite les paramètres caractéristiques des mousses ainsi que le rôle spécifique de chaque ingrédient ; enfin, nous décrirons dans un troisième temps les aspects technologiques de l'opération unitaire de foisonnement.

II.1. GENERALITES SUR LES MOUSSES ALIMENTAIRES

L'une des tendances actuelles du marché des produits alimentaires consiste à proposer aux consommateurs des aliments dits « santé ». Les produits foisonnés s'inscrivent tout à fait dans cette tendance. Perçus comme des produits jeunes, ils jouissent d'une image « forme et santé », synonyme de fort potentiel de développement. Par ailleurs, ils sont d'autant plus intéressants qu'ils sont générateurs de valeur ajoutée, par l'économie de matière à laquelle ils donnent accès, à volume de produit constant, ainsi que par le faible coût opératoire des technologies qui permettent de les élaborer.

II.1.1. Qu'est-ce qu'une mousse ?

Une mousse est communément définie comme une dispersion de bulles d'un gaz dans une phase continue liquide, semi-solide ou solide, celui-ci pouvant être le plus souvent de l'air, du dioxyde de carbone (CO₂), de l'azote (N₂) ou bien du protoxyde d'azote (N₂O). L'incorporation de gaz peut être conduite de différentes façons : par un batteur planétaire, un mixeur ou un foisonneur en continu, ou encore par la création de bulles in-situ... Ces différentes méthodes et technologies font que la structure de la mousse peut être très variable. Par exemple, elle peut aller d'une structure ouverte à une structure fermée, avec une répartition plus ou moins fine et uniforme des bulles de gaz. Sur le plan technologique, on distingue en général deux types de mousses : les mousses liquides et les mousses solides. Les mousses solides sont engendrées par des mousses liquides solidifiées, par exemple par chauffage, et elles possèdent généralement des structures qui découlent des cellules de la

mousse liquide avant solidification. Cette solidification peut également être réalisée par congélation de la phase dispersante (crème glacée) ou par des actions physico-chimiques (par exemple, des agents gélifiants).

L'univers des mousses est très vaste ; la structure aérée d'une mousse se retrouve ainsi sous diverses formes, dans de nombreux produits alimentaires, tels que la crème fouettée, les soufflés, les mousses laitières, les meringues, les gâteaux (génoises, cakes...), mais aussi les pâtes levées comme la brioche ou le pain, sans oublier les mousses éphémères telles que la bière ou le champagne (Figure I.11.). Couramment appelés mousses, de nombreux produits de la charcuterie, n'appartiennent pas à cette catégorie de produit au sens physico-chimique. L'appellation mousse ne repose pas dans ce cas sur la présence de bulles de gaz, mais sur la finesse de la texture. Bien au contraire, les industriels travaillent sous vide, afin d'éliminer au maximum l'air occlus dans certains produits, et donc les problèmes d'oxydation (Roustel, 2000).

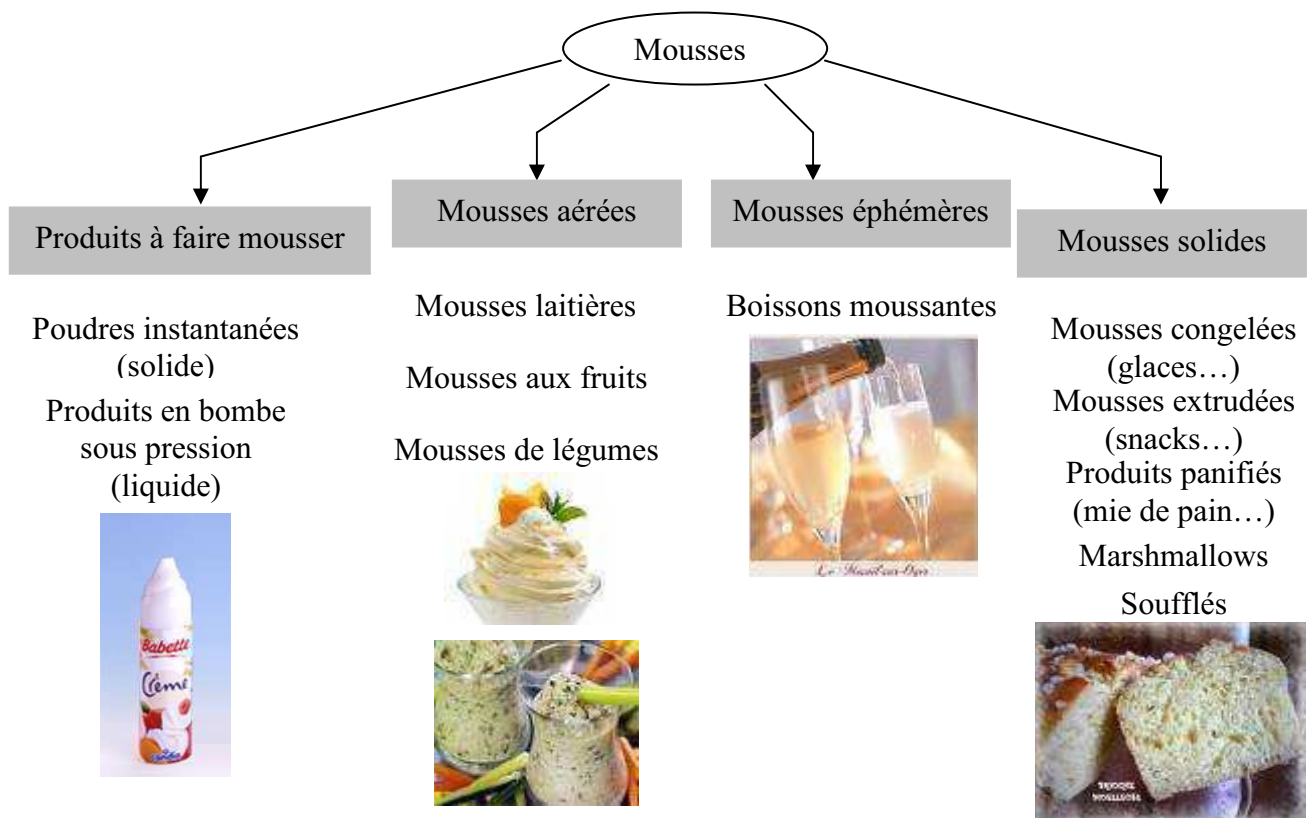


Figure I.11. Panorama des différentes mousses alimentaires (Roustel, 2000).

II.1.2. Fabrication et stabilisation d'une mousse protéique

Le mécanisme de formation et stabilisation de la mousse à base de protéines a été largement étudié ; selon la littérature, il existe trois étapes principales. Dans une première phase, les protéines sériques vont venir se localiser à la surface des bulles en migrant vers celles-ci depuis la phase aqueuse. Cette étape est principalement influencée par l'état de solubilité des protéines sériques (*Turgeon, 1991*). Dans une deuxième phase, les protéines vont s'adsorber à l'interface et s'y déplisser. Contrairement à ce qui se produit dans le cas de certaines émulsions, ces phénomènes de migration et d'adsorption sont quasi-spontanés en raison de la très grande tension de surface au niveau des films interfaciaux. L'adsorption des protéines est généralement partielle et les fragments non adsorbés d'une protéine vont interagir avec d'autres fragments de protéines sériques adjacentes également adsorbées (échange de ponts disulfures selon le pH, liaisons hydrophobes, etc.). La formation du film cohésif qui en résulte permet l'encapsulation des bulles d'air. Ce film protéique doit toutefois conserver un certain degré d'élasticité pour obtenir la texture recherchée (*de Wit et coll., 1988 ; Phillips et coll., 1994 ; Dickinson, 1997 ; Cayot, 1998*). Cette étape est fortement influencée par les caractères d'hydrophobicité et de flexibilité des protéines sériques (*Phillips et coll., 1994 ; Cayot & Lorient 1998*). Il a été démontré qu'une des principales conditions de stabilité d'une mousse est que la phase aqueuse soit visqueuse. Ainsi, le film protéique formé permet dans un troisième temps à la mousse d'être stable en diminuant le drainage gravitationnel de la phase aqueuse et en réduisant les échanges gazeux entre les bulles.

Une représentation schématique des mécanismes mis en jeu dans la fabrication et la stabilisation d'une mousse est présentée sur la Figure I.12. Les phases 1 et 2 traduisent la capacité des protéines sériques à former une mousse et la phase 3 illustre leur aptitude à stabiliser la mousse formée.

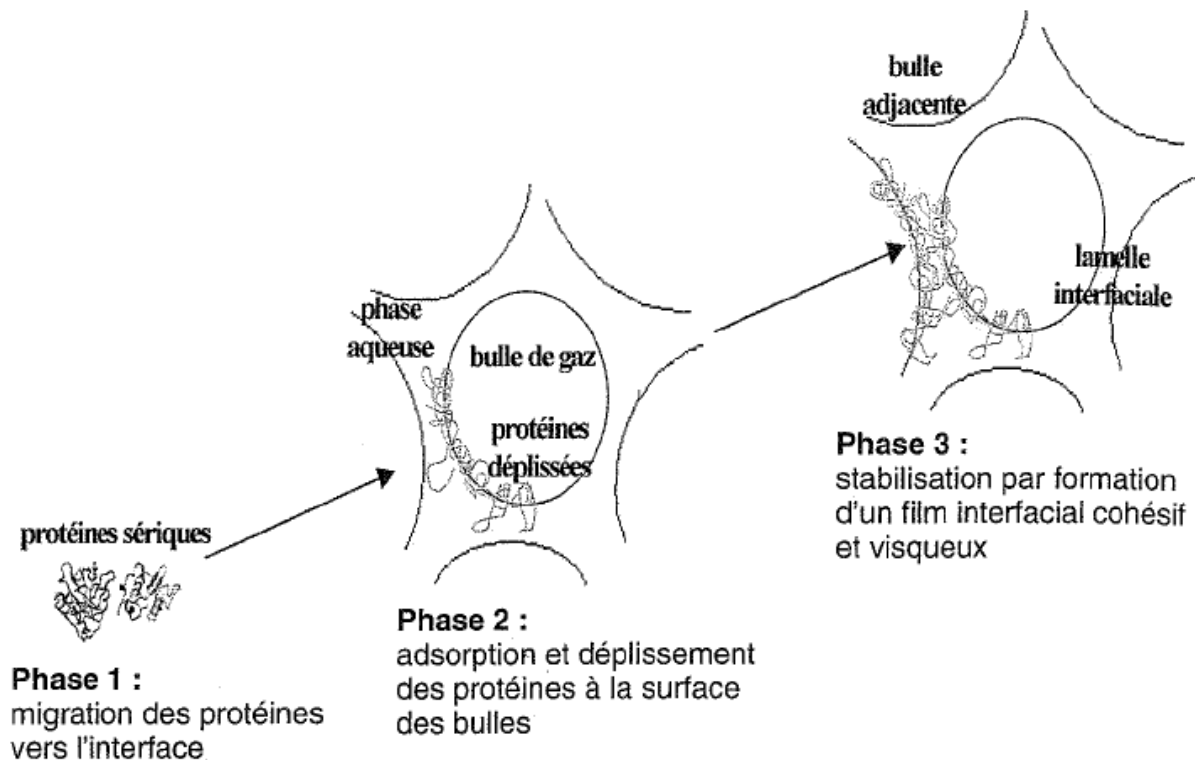


Figure I.12. Représentation schématique des mécanismes intervenant lors de la formation et de la stabilisation d'une mousse par des protéines sériques (Gaucheron, 2004).

II.1.3. Propriétés structurales et physico-chimie des mousses liquides

La structure des mousses est organisée sur plusieurs échelles spatiales (Figure I.13.). A l'échelle macroscopique, une mousse paraît uniforme et homogène. En l'observant à une échelle plus fine, on remarque qu'elle est constituée de bulles de gaz séparées par des films de liquide dont l'épaisseur peut être comprise entre quelques nanomètres et quelques micromètres. A l'échelle moléculaire, ces films sont stabilisés par des agents tensioactifs adsorbés à leurs surfaces.

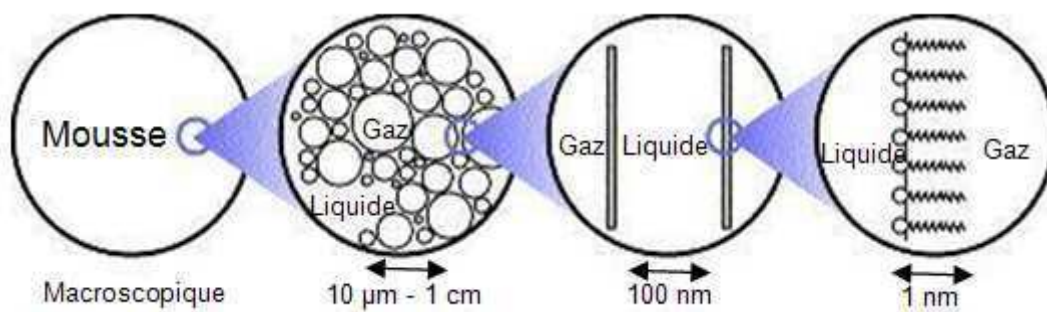


Figure I.13. Schéma d'une mousse aqueuse à différentes échelles d'observation (Bouaouina, 2005).

Les mousses peuvent être classées en plusieurs variétés, en fonction de plusieurs critères :

- ✓ La dimensionnalité : l'empilement des bulles peut s'effectuer dans un plan, ce qui donne les mousses à deux dimensions (2D), ou bien dans un espace à trois dimensions (mousses 3D).
- ✓ La symétrie : si l'empilement des bulles est décrit par un motif répétitif, on parle de mousses ordonnées, sinon de mousses désordonnées.
- ✓ La distribution de tailles de bulles : d'un point de vue théorique, les bulles peuvent être toutes de taille identique (mousses dites monodisperses), mais elles présentent souvent une grande variété de dimensions (mousses dites polydisperses). Les mousses monodisperses sont rares, même si l'on sait les produire expérimentalement, et elles constituent essentiellement un outil pour les travaux théoriques (*Rosa, 2002*). A contrario, la polydispersité est le critère caractérisant la largeur et la non-uniformité de la distribution de tailles de bulles dans une mousse.
- ✓ La fraction volumique de gaz contenue dans la mousse, notée ϕ : elle doit être supérieure à une valeur caractéristique ϕ_c proche de 64%, pour que la structure de mousse liquide résiste aux contraintes statiques. Une mousse est appelée « humide » lorsque ϕ se rapproche de ϕ_c et elle est dite « sèche » lorsque ϕ est proche de 100% (Figure I.14.). Dans le cas où $\phi < \phi_c$, on parle de mousses « liquides ». Ces dernières ne sont pas stables par elles-mêmes et nécessitent une formulation de la phase continue capable d'assurer la stabilité dans le temps recherchée.

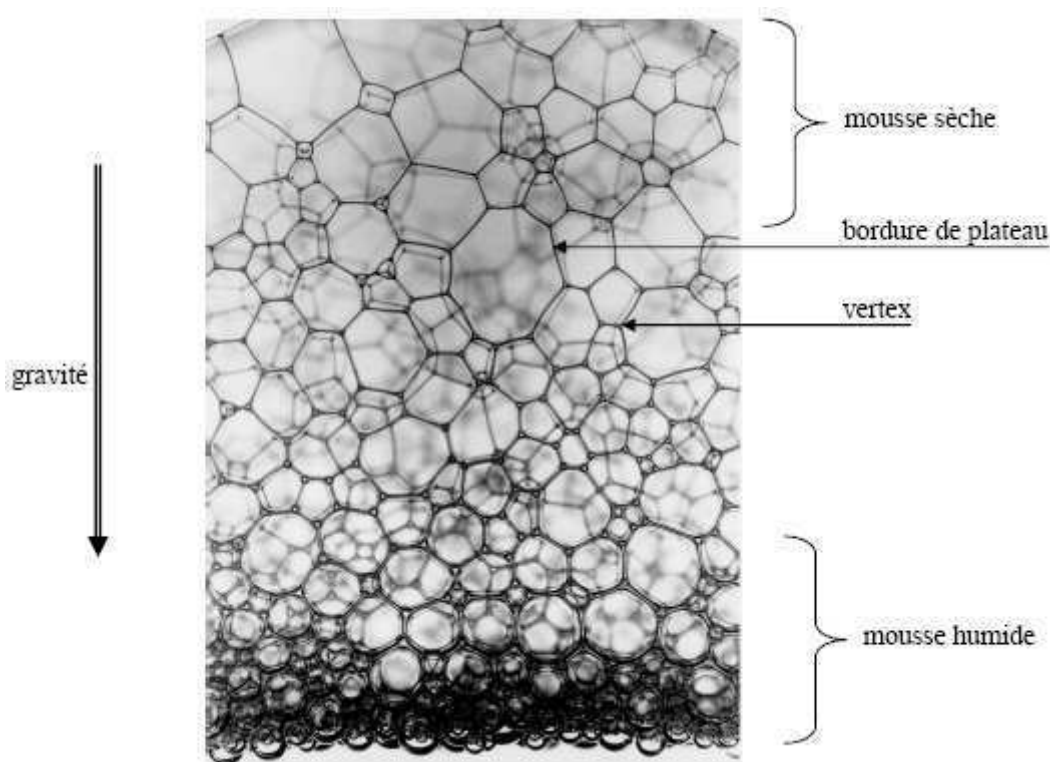


Figure I.14. Photographie d'une mousse aqueuse drainant dans le champ de pesanteur (*Durian^{web}*). On notera le gradient vertical de fraction volumique qui en résulte.

Dans le domaine des mousses liquides, on distingue au niveau structural les mousses à bulles sphériques (dans lesquelles la quantité de gaz incorporé est suffisamment faible pour que les bulles conservent une taille à peu près sphérique) qui sont très instables, et les mousses à bulles polyédriques (mousse de bière par exemple) dans lesquelles le rapport des volumes « gaz sur liquide » est si élevé que les bulles sont comprimées les unes contre les autres selon une structure en nid d'abeille.

Sur le plan physico-chimique, une mousse liquide constitue un état colloïdal de la matière dans la mesure où les films fins qui séparent des cellules adjacentes dans une mousse sont typiquement de dimension colloïdale. On admet qu'une mousse compte environ 10^3 bulles par mL de mousse, alors qu'une émulsion compte en moyenne 10^{11} gouttelettes dispersées par mL d'émulsion. Le volume d'une bulle de gaz est environ mille fois supérieur à celui d'une gouttelette de lipides dans une émulsion, essentiellement parce que les gaz sont solubles dans l'eau. La tension de surface au niveau des bulles de gaz est aussi plus forte que celle qui règne à la surface des globules gras. L'important écart entre les masses volumiques des bulles et de la phase dispersante constitue aussi une des différences les plus notables entre

mousses et émulsions. Elle explique pourquoi le phénomène de crémage (remontée vers le haut des bulles de gaz) est plus rapide dans une mousse. Par conséquent, les mousses sont généralement moins stables que les émulsions.

Pour augmenter la stabilité d'une mousse liquide, plusieurs approches sont donc possibles :

a) l'augmentation de la rigidité du film interfacial par :

- ✓ la dénaturation accompagnée d'une gélification des protéines aux interfaces ou bien par une concentration interfaciale des protéines plus élevée ;
- ✓ l'addition de polysaccharides dans le but de former des complexes protéines-polysaccharides stabilisants ;
- ✓ la diminution de la teneur en protéines flexibles (par exemple la caséine β) qui forment des bulles assez grosses et des mousses instables ;
- ✓ l'augmentation de la teneur en protéines globulaires (par exemple le lysozyme) qui forment de petites bulles et des mousses plus stables.

b) l'augmentation de la viscosité de la phase liquide dispersante par :

- ✓ l'addition de polysaccharides ou plus généralement d'hydrocolloïdes ;
- ✓ l'accroissement de la concentration en protéines (bulles plus petites et mousses plus fermes).

c) l'augmentation des particules solides à l'interface gaz-liquide par la cristallisation de la matière grasse globulaire dans le cas des émulsions foisonnées ;

d) la diminution de la tension interfaciale, par exemple par une addition limitée d'éthanol (Roustel, 2000).

Il faut cependant noter que certaines de ces approches peuvent avoir un effet négatif sur l'étape de formation des bulles, comme par exemple former des mousses plus stables au prix de bulles plus grosses.

II.2. GRANDEURS CARACTERISTIQUES DES MOUSSES PRODUITES INDUSTRIELLEMENT

A la différence des mousses liquides, les mousses rencontrées dans l'industrie alimentaire sont soit solides, soit semi-solides. Les propriétés des mousses peuvent être décrites à partir de quatre paramètres caractéristiques :

- ✓ le taux de foisonnement ;

- ✓ la distribution spatiale du gaz et les propriétés géométriques des bulles (distribution des tailles, facteurs de forme...) ;
- ✓ la texture des mousses ;
- ✓ leur stabilité dans le temps.

On notera que les deux premiers paramètres cités caractérisent la structure des mousses, tandis que les deux suivants constituent plutôt des propriétés d'usage résultant de la microstructure.

II.2.1. Taux de foisonnement

La fraction volumique de gaz et le taux de foisonnement sont deux paramètres permettant d'évaluer la quantité de gaz incorporée dans les mousses. Pour les produits foisonnés dans les industries alimentaires, on préfère généralement utiliser la notion de *taux de foisonnement* (TF) ou *overrun* en anglais qui représente l'expansion de volume due au gaz ramenée sur le volume initial de matière première ou base V_L . Le taux de foisonnement s'obtient donc à partir des masses volumiques ρ par la relation suivante :

$$TF = \frac{\rho_{base} - \rho_{mousse}}{\rho_{mousse}} \quad \text{Equation I.2.}$$

En revanche, la fraction volumique de gaz incorporé lors du foisonnement φ , est calculée avec la formule suivante :

$$\varphi = \frac{\rho_{base} - \rho_{mousse}}{\rho_{base}} \quad \text{Equation I.3.}$$

Tableau I.1. Taux de foisonnement pour certains produits aérés courants (Campbell & Mougéot, 1999).

<i>Produits aérés</i>	<i>TF</i>	<i>Produits aérés</i>	<i>TF</i>
<i>Popcorn</i>	0,95	<i>Crème fouettée</i>	0,4-0,6
<i>Gâteau de riz</i>	0,9-0,92	<i>Crème glacée</i>	0,5
<i>Meringue</i>	0,88-0,9	<i>Barres chocolatées</i>	0,4-0,45
<i>Blanc d'œuf battu</i>	0,8-0,85	<i>Nougat</i>	0,3-0,4
<i>Marshmallow</i>	0,68-0,75	<i>Mousses de fruits</i>	0,25-0,3
<i>Gâteau</i>	0,68-0,72	<i>Mousses de légumes</i>	0,3-0,4
<i>Beurre foisonné</i>	0,1-0,3	<i>Fromages à tartiner</i>	0,05-0,2
<i>Milkshake</i>	0,09-0,13	<i>Pâte à pain (avant levée)</i>	0,04-0,08

Le Tableau I.1. résume quelques exemples de produits aérés très souvent rencontrés sur le marché des produits alimentaires et précise la quantité moyenne d'air incorporé.

II.2.2. Distribution spatiale du gaz

La distribution spatiale du gaz et la distribution des tailles des bulles comptent parmi les paramètres les plus difficiles à mesurer et à analyser. Cependant, l'évolution de la distribution des tailles au cours du temps est d'une importance capitale, car elle est étroitement liée à la stabilité et donc à la qualité du produit telle qu'elle est perçue par le consommateur (*Halling, 1981; Campbell & Mougeot, 1999*). Dans certains systèmes, des bulles de taille uniforme peuvent être souhaitables (par exemple, la pâte à pain et la pâte à gâteau), dans le but d'améliorer les caractéristiques de cuisson, tandis que dans d'autres, une distribution plus large peut être avantageuse pour donner la sensation en bouche souhaitée.

En ce qui concerne les milieux transparents tels que la bière et le vin, la distribution spatiale du gaz peut être observée à l'œil nu et les propriétés des bulles incluent des caractéristiques telles que leur vitesse de nucléation et leur vitesse d'ascension vers la surface. Le comportement interfacial des milieux aérés transparents peut être facilement observé alors que le comportement des bulles dans les produits opaques est plus difficile à étudier. Quand le milieu est solide ou semi-solide, il peut être découpé en tranches afin de visualiser les bulles. Dans le cas des petites bulles, on utilisera la microscopie optique, voire la microscopie électronique pour les distinguer. Récemment, l'usage de la tomographie pour reconstruire des images à trois dimensions de la structure interne des systèmes aérés a été développé.

Historiquement, la taille et la morphologie des bulles ont été mesurées à partir de photographies sur des échantillons prélevés en cours ou en fin de dispersion, voire pendant le stockage de la mousse. Une variante améliorée permettant la mesure en cours de dispersion ou en sortie d'un foisonneur continu consiste à utiliser des zones ou des cellules de visualisation en verre, quartz ou plexiglas. Dans tous les cas, les photographies peuvent maintenant être analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images qui donne accès à une analyse statistique des paramètres morphologiques des bulles. La précision de ces techniques est cependant compromise par le fait que des biais peuvent être induits lorsque l'on analyse une structure à trois dimensions à partir d'une image en deux dimensions. En outre, il peut parfois être difficile d'obtenir des images nettes. De plus, les défauts de planéité des échantillons prélevés, la présence de parois et de coudes dans la cellule de visualisation ou encore la nécessité de travailler en couche mince font partie des nombreuses sources d'erreurs qui entachent la

fiabilité de ce type de mesure. Toutefois, ces méthodes présentent un bon rapport efficacité/coût, et un certain nombre de dispersions de gaz et de mousses, telles que la pâte à pain ou la pâte à gâteau, ont pu être examinées en utilisant la technique photographique classique.

Les progrès récents des logiciels d'analyse d'images ont fait de cette méthode une des plus rapides et des plus efficaces (*Hepworth et coll., 2004*). En particulier, pour les mousses à bulles sphériques, l'analyse d'images permet d'accéder facilement aux diamètres moyens et l'analyse peut fournir simultanément une indication de la répartition des tailles des bulles, sachant qu'une mousse présentera des propriétés sensorielles et une stabilité au cours du temps différentes selon que sa population de bulles est homogène ou hétérogène. Parmi les diamètres moyens, on recense le diamètre moyen en nombre d_{10} , le diamètre de Sauter d_{32} (ou diamètre moyen en surface) et le diamètre moyen en volume d_{43} . La distribution des tailles de bulles peut servir à caractériser les mousses formées. La taille moyenne (diamètre moyen) influence fortement l'aspect visuel du produit. Par exemple, les bulles doivent être visibles dans le cas de la mousse au chocolat, mais non dans le cas de la crème glacée ; de même, la largeur de la distribution ne conditionne pas seulement l'uniformité du produit foisonné, mais également sa texture (*Thakur et coll., 2005*) et sa stabilité dans le temps (*Campbell et coll., 1999*). Selon les conditions de procédé et de formulation, la polydispersité des diamètres peut être plus ou moins grande.

Un exemple type de distribution des tailles de bulles est représenté sur la Figure I.15. Il faut également considérer l'évolution du système au cours du temps, car la polydispersité influe sur la stabilité de la mousse ; cela revient en pratique à observer les modifications de la structure en suivant notamment les indicateurs que sont le diamètre moyen et la largeur de la distribution de taille des bulles. De plus, la modélisation de leurs évolutions au sein de la structure peut permettre de quantifier l'impact des paramètres « procédé » et « formulation » sur l'évolution globale de la mousse.

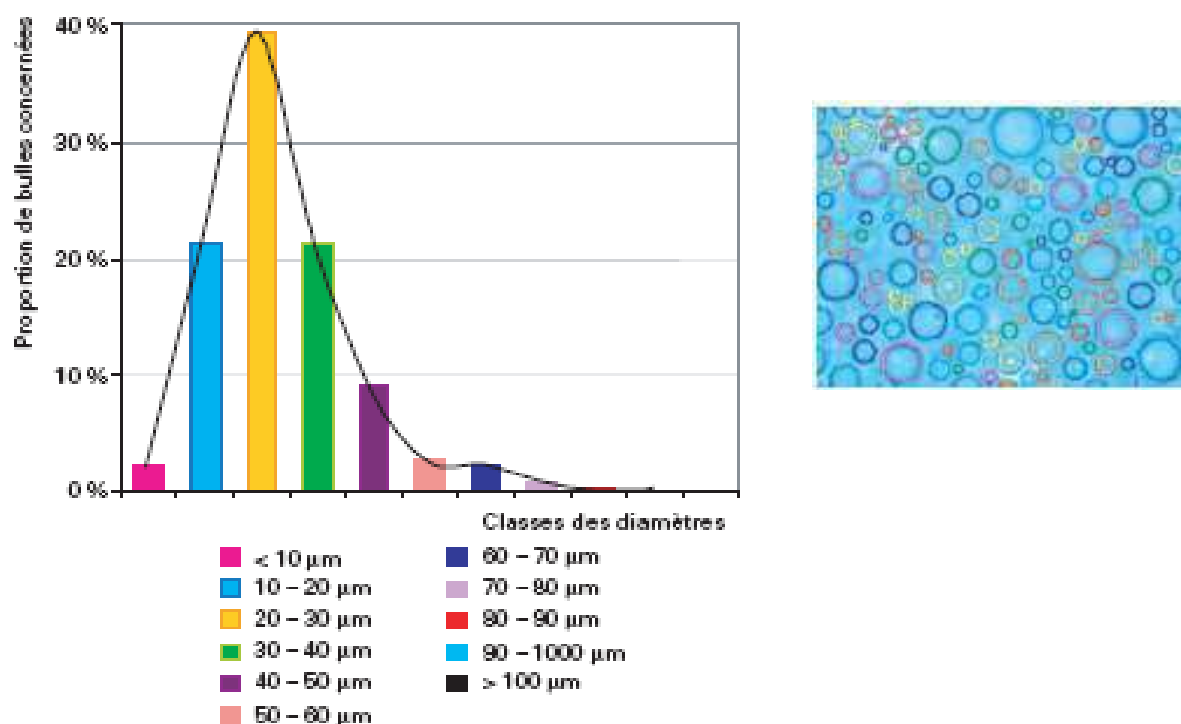


Figure I.15. Exemple de distribution des tailles de bulles d'une mousse laitière (Schorsch, 2007).

Plus récemment, de nombreuses techniques alternatives ont été proposées. Par exemple, la tomographie à rayons X (Figure I.16.) est devenue un outil précieux pour la visualisation d'un grand nombre de produits alimentaires, tels que les mousses aux fraises ou les muffins au chocolat (Lim & Barigou, 2004). Cette technique évite les traitements laborieux de préparation des échantillons et elle est particulièrement adaptée dans l'analyse des aliments fragiles contenant des bulles de gaz. Lorsqu'elle est utilisée en conjonction avec un logiciel d'images (tel que, Image Pro[®]Plus, Visilog[®]...), elle permet de visualiser avec succès des sections d'aliments contenant des bulles, donnant des informations à la fois sur le nombre de bulles, la distribution des tailles ainsi que la distribution spatiale du gaz, par exemple dans le cas des chocolats aérés. Cependant, avec les équipements actuellement disponibles, l'application de rayons X reste assez limitée, uniquement dans le cas de structures stables (telles que les mousses solides) et elle n'est utilisable que si les tailles de bulles sont supérieures à 50 μm (Haedelt, 2005).

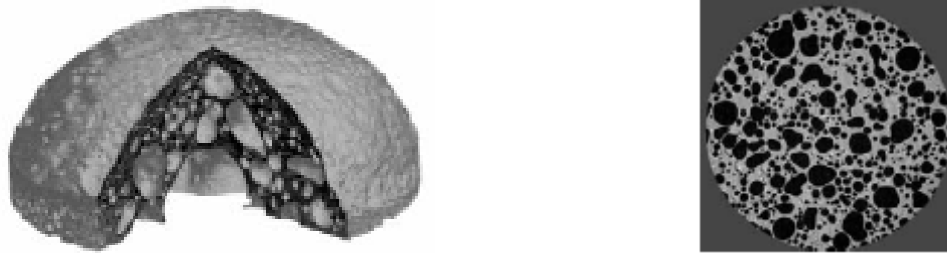


Figure I.16. Tomographie rayons X des bulles dans le pain (Babin et coll., 2006).

Pour toutes les études de développement de mousses, le recours à des analyses structurales plus poussées s'avère obligatoire. La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) permet de marquer les protéines, les matières grasses et certains polysaccharides au moyen de sondes fluorescences qui vont permettre de les localiser spatialement dans la mousse, donc au sein de la matrice, mais aussi aux interfaces avec les bulles de gaz (Figure I.17.). La résolution étant celle de la microscopie optique, elle atteint le micromètre. Cette méthode est donc bien adaptée pour étudier les microstructures complexes telles que les mousses d'albumen (Lau & Dickinson, 2004) et des émulsions contenant des œufs, du sucre et des protéines de lait (Martin et coll., 2005). Son utilisation reste pour l'instant limitée à cause du coût élevé des marqueurs fluorescents.

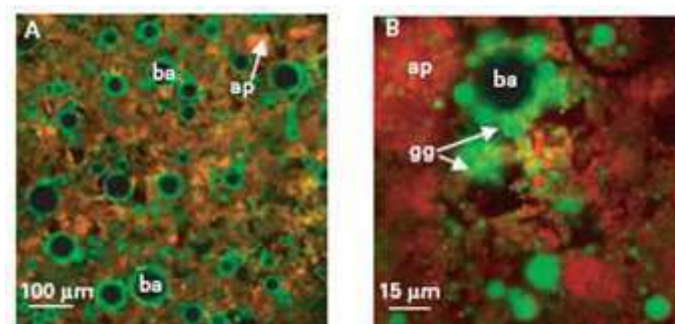


Figure I.17. Images de mousses laitières observées en microscopie confocale (Schorsch, 2007).

II.2.3. Propriétés rhéologiques des mousses

Au niveau industriel ou commercial, la mesure des propriétés rhéologiques est un outil très répandu afin de caractériser les attributs texturaux des produits alimentaires tels que l'onctuosité, la capacité d'étalement et la consistance, mais également pour contrôler leurs propriétés d'écoulement au cours des opérations unitaires telles que le pompage et le mélange. En effet, d'après Bekkour & Lounis (2004) l'application de contraintes de cisaillement lors

d'opérations de mélanges, d'écoulement ou d'injections, peuvent modifier leur structure, leur texture et donc leurs propriétés.

Les mousses sont généralement des produits semi-solides au repos, mais facilement tranchables et souples en bouche. La texture des produits foisonnés est généralement quantifiée par des méthodes issues de la rhéologie sous cisaillement ou de la pénétrométrie (*Jakubczyk & Niranjana, 2006*).

Les facteurs clefs qui contrôlent la texture des produits foisonnés sont encore la viscosité de la phase continue, le taux de foisonnement, les propriétés interfaciales et le diamètre des bulles (*Thakur et coll., 2006 ; Thakur et coll., 2005 ; Vial et coll., 2006*). Des analyses rhéologiques en mode dynamique ont été réalisées sur la crème fouettée et sur les gâteaux moelleux, non seulement afin d'évaluer leurs propriétés rhéologiques, mais également dans le but de suivre la manière dont ces propriétés vont changer au cours de l'aération (*Massey, 2002 ; Jakubczyk & Niranjana, 2006*). Même si une phase continue est très visqueuse, l'incorporation des bulles d'air devrait rendre le mélange gaz/liquide plus rigide (prédominance des propriétés élastiques sur les propriétés visqueuses). Toutes les sortes de crèmes fouettées étudiées par *Jakubczyk & Niranjana (2006)* ont montré un comportement viscoélastique, une forte augmentation des modules viscoélastiques G' et G'' étant observée durant le foisonnement ; ceci est attribué à la présence des bulles ainsi qu'aux agglomérats de matière grasse. De même, *Massey (2002)* a également décrit la formation d'un système plus rigide lorsque l'aération a été réalisée par un procédé mécanique de foisonnement.

Thakur et coll. (2003, 2005) ont montré que la texture d'un produit foisonné dépend surtout de la façon dont les bulles s'intègrent dans la microstructure de la phase continue et de leur aptitude à former des réseaux entre elles et à favoriser la formation de réseaux dans la phase continue. De même, *Smith et coll. (2000)* ont analysé l'influence de la microstructure des crèmes glacées sur la texture. Ils ont observé que les modules élastique (G') et visqueux (G'') ont tous les deux diminué et que la mousse présentait une structure poreuse due à l'augmentation de la taille des bulles durant la période de stockage. *Windhab (2003)* a conclu à une forte corrélation entre la microstructure et la rhéologie ; par la suite, ce sont ces deux familles de critères qui gouverneront les qualités finales des produits foisonnés (cf. Figure I.17.).

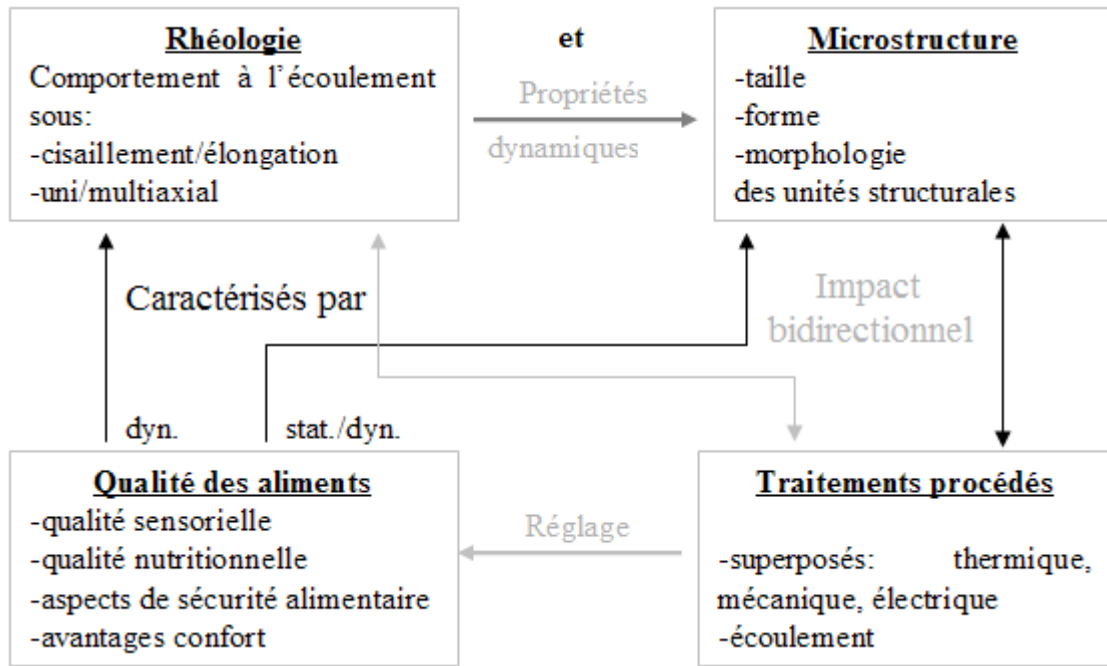


Figure I.17. Schéma descriptif de la relation microstructure-rhéologie avec le traitement et la qualité des produits pour des systèmes alimentaires polyphasiques (Windhab, 2003).

Étant donné que l'une des principales raisons d'incorporer des bulles d'air dans les aliments est de leur conférer des caractéristiques texturales particulières, la caractérisation rhéologique de la dispersion est une étape absolument essentielle pour estimer la qualité du produit. Par exemple, l'augmentation de la viscosité de la phase continue peut être défavorable à l'incorporation de l'air en ralentissant la diffusion du surfactant à l'interface ; toutefois, elle favorise la stabilité de la dispersion gaz/liquide déjà formée, en retardant ainsi le drainage du liquide (Halling, 1981 ; Lau & Dickinson, 2004).

De nombreuses études (Princen & Kiss, 1986 ; Mason et coll. 1995 ; Saint-Jalmes & Durian, 1999 ; Rouyer et coll., 2005) ont également été menées, se focalisant essentiellement sur l'interdépendance entre le taux de foisonnement, les propriétés interfaciales (exprimées par la tension de surface), le diamètre moyen (d_{32}) des bulles et les propriétés rhéologiques des mousses.

D'un point de purement théorique, dans le cas des mousses sèches, G' varie selon la fraction volumique de gaz $\phi = TF / (1 + TF)$, la tension de surface (σ) et d_{32} . Le modèle le plus courant a été proposé par Princen & Kiss (1986) :

$$G' = 2k \cdot \frac{\sigma}{d_{32}} \cdot \phi^a \cdot (\phi - \phi_c) \quad \text{Equation I.4.}$$

avec $k=1,77$, $a=1/3$ and $\varepsilon_c=0,712$. Dans le cas des mousses sèches polyédriques, les constantes a et φ_c dépendent de la distribution des tailles dans la mousse. Toutefois, *Mason, Bibette & Weitz (1995)* ont rapporté des valeurs très différentes de celles présentées par *Princen & Kiss (1986)* pour les paramètres de l'Equation I.4. pour des gouttelettes de forme sphérique dans une émulsion, $a=1$ et $\varphi_c=0.63$, tandis que *Höhler, Cohen-Addad & Asnacios (1999)* ont rapporté que le paramètre k dépend également de la distribution des bulles dans la mousse. La relation théorique entre d'une part G' ou bien une contrainte seuil, et d'autre part d_{32} , à partir de la caractérisation rhéologique des mousses a été toutefois vérifiée dans le cas de plusieurs systèmes foisonnés modèles, ainsi que sur des émulsions concentrées, mais aussi lors de la caractérisation d'aliments foisonnés réels dans lesquels la structure de la mousses est stabilisée par les protéines (*Pernell et coll., 2002*). Toutefois, dans le cas des mousses protéiques générées à partir des solutions dans lesquelles la concentration en protéines dépasse largement la proportion nécessaire afin de saturer l'interface, il existerait d'autres facteurs qui pourraient influencer la valeur de la contrainte seuil. Par exemple, la viscosité et/ou l'élasticité du film interfacial ainsi que la formation des agglomérats protéiques dans la lamelle ou la possibilité d'interaction avec des protéines placées à l'interface, pourraient également modifier la contrainte seuil ainsi que G' .

II.2.4. Stabilité des mousses dans le temps

La mousse est un objet instable, donc éphémère, l'état thermodynamiquement stable étant celui où liquide et gaz sont séparés. Une mousse « vieillit » et se transforme sous les actions croisées de différents processus irréversibles. Généralement, la stabilité de la mousse est donc caractérisée par son aptitude à maintenir ses paramètres constants dans le temps (taille moyenne des bulles, distribution de tailles de bulles, teneur en liquide et volume total de mousse). Trois mécanismes principaux conduisent à la déstabilisation de la mousse : le drainage, le mûrissement et la coalescence. Toutefois, l'étude de la stabilité des mousses sèches concerne principalement le drainage car il constitue le phénomène de déstabilisation le plus fréquemment observé dans ce type de mousses.

II.2.4.1. Le drainage

Sous l'action de la gravité, l'eau s'écoule dans la mousse et sa fraction volumique de liquide diminue. Ce phénomène correspond au *drainage*. L'eau contenue dans la mousse s'écoule principalement dans les bords de Plateau et les nœuds (Figure I.19.). Bien qu'il s'agisse d'un écoulement du liquide dans les films, il dépend fortement des propriétés de la mousse discutées précédemment, telles que la taille de bulles, le taux de foisonnement...

L'évolution de la fraction de liquide sous l'effet de la gravité et des forces de capillarité a été décrite théoriquement et différents modèles ont été proposés dans la littérature.

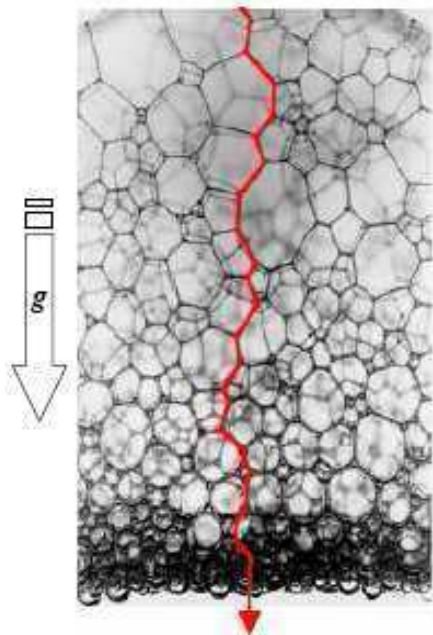


Figure I.19. Ecoulement du liquide à travers la mousse sous l'effet de la gravité.

La vitesse de drainage mesurée dans des conditions similaires peut être utilisée pour comparer différentes mousses, en étudiant le processus de drainage pendant toute la durée de vie de la mousse. Toutefois, cette mesure n'a pas de relation directe avec la vitesse de décroissance de la surface spécifique de la mousse ou encore avec la vitesse de séparation de la mousse en deux phases : liquide et gaz. C'est la raison pour laquelle le drainage ne peut pas être regardé comme une mesure de la stabilité par rapport à la destruction interne, c'est-à-dire à « l'effondrement » de la mousse. La principale méthode permettant d'estimer l'effondrement consiste à suivre la cinétique de diminution de la surface spécifique à partir de l'évolution de la taille moyenne de bulles. Pour une mesure complète de la stabilité d'une

mousse, les deux processus, i.e. le drainage et la destruction interne, doivent impérativement être confrontés.

La géométrie des bulles dans la mousse dépend du rapport entre les volumes de gaz et de liquide, du degré de dispersion du gaz et de l'empilement des bulles. Il existe deux catégories principales de mousses : celles qui ne sont stables que pendant quelques secondes ou minutes (champagne...) et celles qui présentent une grande stabilité de l'ordre de quelques heures, jours ou même mois (telles que la mousse au chocolat, la meringue, les biscuits de type « cuiller », la brioche...). Dans le premier cas, les bulles coalescent rapidement parce que les films qui les séparent se cassent et que le liquide présent dans la mousse draine rapidement sous l'effet de la gravité. Dans le deuxième cas, la rupture des films doit franchir une barrière énergétique avant la destruction.

L'écoulement du liquide d'une mousse représente donc la dernière étape d'un mécanisme complexe qui comprend de nombreux processus en série et en parallèle, tels que l'écoulement du liquide à travers les bords de Plateau et les films, l'amincissement des films et leur rupture éventuelle. Dans certains cas, le drainage ne commence pas tout de suite après la formation de la mousse, mais seulement après un certain temps appelé « temps d'induction de drainage ». Ce temps représente la durée nécessaire à l'apparition de la première goutte de liquide à l'extérieur de la mousse. Il dépend de la hauteur de la colonne de la mousse, du taux de foisonnement, du type de tensioactif et de sa concentration, mais aussi de la composition de la solution mise en œuvre pour la préparation de la mousse. Cette période est liée à la quantité de liquide présente respectivement dans les films et les bords de Plateau le long de la colonne de mousse, mais également à la cinétique de destruction interne de la mousse. Dans le cas d'une mousse obtenue par barbotage du gaz au sein du liquide, ce temps d'induction est absent et la vitesse de drainage diminue continuellement durant le drainage (*Ekserova et coll., 1997*).

En résumé, le processus de drainage comporte en général plusieurs étapes qui sont les suivantes :

- ✓ l'écoulement du liquide présent dans les films vers les bords de Plateau ;
- ✓ la redistribution du liquide au sein de la mousse due à la coalescence des bulles et à sa destruction interne ;
- ✓ l'accumulation du liquide dans la partie basse de la mousse ;
- ✓ l'écoulement du liquide à l'extérieur de la mousse.

Si l'excès de liquide dans la mousse est très important, les trois premières étapes sont capitales. Quand la viscosité de la solution et le taux de foisonnement augmentent ou bien

quand la hauteur de la mousse diminue, l'écoulement du liquide vers les bords de Plateau est ralenti : cela se traduit sur les courbes de drainage par une augmentation du temps d'induction. En effet, si la pression du liquide dans la partie basse de la mousse ne devient pas plus importante que la pression atmosphérique, il n'y aura pas de drainage pendant toute la période de temps correspondant au temps d'induction.

II.2.4.1.1. Description mathématique des courbes de drainage

Dès sa formation, la mousse ne se trouve plus dans un état d'équilibre thermodynamique. La quantité de liquide contenue dans la mousse est en effet plus importante qu'à l'équilibre hydrostatique. Pour cette raison, le liquide commence à s'écouler dans la microstructure dès la formation de la mousse. Le drainage débute par l'écoulement de l'excès de liquide à travers les bords de Plateau (Figure I.20.) en direction de l'extérieur de la mousse jusqu'à atteindre l'équilibre hydrostatique. En effet, la pression dans les bords de Plateau est plus faible que dans les films adjacents à cause du rayon de courbure des bords de Plateau.

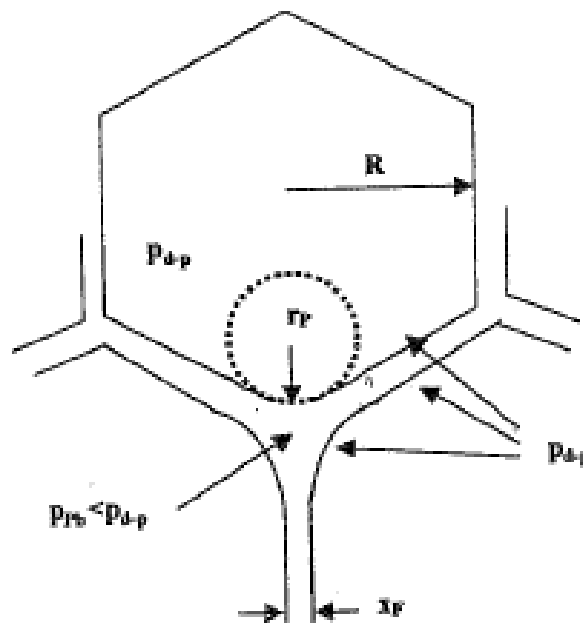


Figure I.20. Section transversale d'un bord de Plateau (Dumitrascu, 2004).

Au niveau d'un bord de Plateau, la relation de Laplace permet d'exprimer la différence de pression ($P_{d-p} - P_{pb}$) en fonction du rayon de courbure de l'interface. P_{d-p} représentant la pression de l'air au sein de la bulle et P_{pb} la pression du liquide au niveau du bord de Plateau.

$$P_{pb} = P_{d-p} - \frac{2\sigma}{r_p} \quad \text{Equation I.5.}$$

où σ et r_p représentent respectivement la tension de surface et le rayon de courbure du bord de Plateau. Dans le cas des films verticaux, le drainage est donc non seulement dû à la gravité, mais aussi à la différence de pression entre les bords de Plateau et les films, alors que seul le second mécanisme prévaut dans le cas des films horizontaux.

Construire une courbe de drainage consiste à tracer la fraction de liquide drainée (F) en fonction du temps. F est définie comme le volume de solution drainée (V_{dr}) rapporté au volume initial de solution présent dans la mousse (V_0) :

$$F = \frac{V_{dr}}{V_0} \quad \text{Equation I.6.}$$

Généralement, les courbes de drainage peuvent être constituées de trois phases : une phase d'induction (dont la durée correspond à l'apparition de la première goutte de liquide à l'extérieur de la mousse), une phase de drainage à vitesse constante et une phase au cours de laquelle la vitesse de drainage diminue jusqu'à devenir enfin nulle.

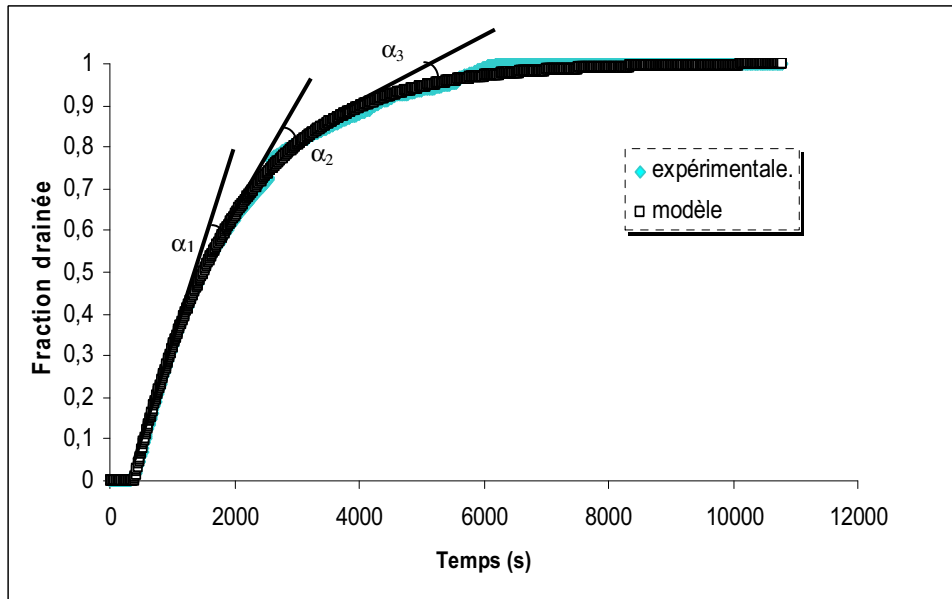


Figure I.21. Exemple de courbe de drainage.

La pente de la deuxième phase permet de mesurer la vitesse maximale de drainage et la valeur de l'asymptote donne la fraction drainée pour un temps infini de drainage (F_{infini}).

Pour les protéines, plusieurs équations donnant le volume de drainage ont été proposées dans la littérature (Bikerman, 1973 ; Ekserova et coll., 1997). La plus simple

suppose que la vitesse de drainage est proportionnelle à tout instant à la quantité de liquide encore présente dans la mousse et correspond à une loi exponentielle (Figure I.21.) :

$$V = V_0(1 - e^{-kt}) \quad \text{Equation I.7.}$$

où V (mL) est le volume de liquide drainé pendant un temps t (min), V_0 (mL) est le volume de liquide initialement présent dans la mousse et k (min^{-1}) est une constante cinétique. Exprimée en termes de fraction volumique drainée F , cette équation devient :

$$F = V / V_0 = (1 - e^{-kt}) \quad \text{Equation I.8.}$$

Elle peut être adaptée au cas où il existe un temps d'induction en faisant débiter l'échelle des temps à la fin de la période d'induction.

II.2.4.1.2. Facteurs influençant le phénomène de drainage

D'après ce qui a été dit précédemment, de nombreux facteurs influencent la stabilité de la mousse, en particulier des paramètres physiques, physico-chimiques et géométriques. La production de mousses à grande échelle implique dans un premier temps l'optimisation des paramètres physico-chimiques. La possibilité de contrôler ces paramètres résulte du fait qu'il y a une grande dépendance entre les propriétés de la solution (concentration en tensioactif, viscosité, présence d'additifs...) et les caractéristiques finales de la mousse. En conséquence, les principaux facteurs influençant le drainage sont respectivement :

a) la viscosité de la solution :

D'après de nombreuses études concordantes (*Bikerman, 1973*), la viscosité agit sur la vitesse de drainage et aussi sur le temps d'induction. Si la viscosité est augmentée, la durée du drainage sera plus importante, mais toute la solution finira cependant par drainer jusqu'à atteindre un équilibre hydrostatique qui n'est pas modifié.

b) la viscosité de surface et son rôle stabilisateur au niveau des films :

D'après Plateau (*Plateau, 1861*), chaque film est stratifié et a une structure de « sandwich ». La couche interne a la viscosité du liquide, mais les deux couches externes ont une viscosité apparente plus élevée et un comportement non-newtonien. Les couches externes possèdent un seuil d'écoulement et ont donc en plus une composante solide.

c) la quantité de tensioactif et la tension superficielle :

Ces deux paramètres influencent la stabilité d'une mousse. L'abaissement de la tension superficielle par l'introduction de tensioactif a pour effet de stabiliser la mousse. L'effet Marangoni qui stabilise les films est influencé quantitativement par la tension de surface

et par les caractéristiques du tensioactif, ainsi que par sa concentration. Dans la plupart des études, la quantité de tensioactif est prise en compte quasiment exclusivement au travers de la valeur de la tension de surface car les quantités utilisées restent en deçà ou proches de la concentration micellaire critique (CMC). La situation est cependant différente pour les protéines qui abaissent beaucoup moins la tension superficielle et qui sont en général toujours en grand excès par rapport à la CMC, ce qui a pour conséquence l'absence d'effet Marangoni.

d) le diamètre moyen et la distribution des tailles des bulles :

Ces paramètres jouent un rôle essentiel sur la solubilité du gaz et sur le transfert du gaz dans le liquide. De plus, ils ont également une grande influence sur le drainage. En effet, ils affectent directement les caractéristiques géométriques des films et des bords de Plateau et ils modifient donc l'écoulement du liquide. *Rand & Kraynik (1983)* ont montré que le débit de drainage d'une mousse est étroitement lié à la taille de bulles, ainsi qu'à la pression à laquelle la mousse a été générée.

e) la fraction de liquide :

Elle constitue un des éléments essentiels régissant le drainage. En effet, les mécanismes seront différents selon que la mousse contient beaucoup de liquide ou qu'elle est « sèche ». Si la mousse est très chargée en liquide, les films sont épais et le drainage est essentiellement régi par la gravité. Quand la mousse est peu chargée en liquide, les forces de surface et de capillarité s'opposent à la pesanteur et peuvent stabiliser la mousse.

f) de petites quantités d'additifs ou d'impuretés solubles :

Celles-ci peuvent affecter de manière significative les propriétés des mousses. Pour qu'une mousse soit stable, la présence d'un mécanisme qui puisse empêcher son évolution dans le temps est nécessaire. Il existe plusieurs mécanismes par lesquels des additifs peuvent agir sur la stabilité de la mousse, comme par exemple une modification de l'élasticité des films, de la solubilité du gaz... Si les additifs qui stabilisent les mousses peuvent être des alcools ou des macromolécules (par exemple des composés polyéthoxylés), il faut également tenir compte de la présence éventuelle d'impuretés qui peuvent avoir un effet opposé sur la stabilité des mousses.

g) les nanoparticules solides :

Elles sont connues comme étant de possibles agents stabilisants des mousses, bien que cet effet dépende fortement de leur hydrophobicité (*Horozov, 2008*). L'effet stabilisant des nanoparticules provient de leur agrégation à la surface des films liquides : un empilement compact de particules prévient la coalescence des bulles. L'effet des nanoparticules

dépend de leur taille et la stabilisation semble favorisée par des particules fines. Un mécanisme susceptible d'expliquer la stabilisation des mousses contre le drainage par des particules solides est que les bords de Plateau deviennent plus proches et qu'ils deviennent plus rugueux, alors que les films deviennent des milieux poreux dont la tortuosité augmente, ce qui ralentit l'écoulement du liquide. Enfin, la présence des particules solides stabilise également la mousse par une augmentation de la viscosité de la phase continue, ce qui ralentit le drainage.

II.2.4.2. Mûrissement d'Ostwald

Le *mûrissement d'Ostwald* (encore appelé *disproportionnement*) est un phénomène d'origine thermodynamique qui est lié à la solubilité du gaz dans la phase continue. La pression à l'intérieur de la bulle est supérieure à la pression extérieure. Cette différence de pression, appelée pression de Laplace (ΔP), est d'autant plus forte que le diamètre de la bulle (d) est faible et que la tension interfaciale (σ) est grande :

$$\Delta P = \frac{4\sigma}{d} \quad \text{Equation I.9.}$$

Le gaz étant soluble dans la phase aqueuse, il diffuse des petites vers les grosses bulles. Les mécanismes responsables de la disparition des bulles les plus petites par solubilisation et par diffusion du gaz au profit des bulles les plus grosses (qui voient donc leur taille encore s'accroître) sont donc connus sous le nom de *maturation d'Ostwald* et de *disproportionnement*. Ils constituent le principal facteur d'instabilité des mousses qui ont été stabilisées contre le drainage (Dickinson, 1992 ; Walstra & de Roos, 1993). La vitesse de diffusion du gaz est fonction de sa solubilité dans la phase liquide, de la pression dans les bulles et donc de leur taille, mais aussi de la nature du gaz et de la composition de la phase liquide. La diffusion des gaz ne peut jamais être totalement arrêtée. Pour accroître la stabilité d'une mousse, l'utilisation préférentielle du diazote à la place du dioxyde de carbone très soluble dans l'eau est recommandée. Un autre moyen consiste à réduire la polydispersité des bulles.

Le gaz dans les bulles peut aussi se dilater lors d'une diminution de la pression et sous l'effet d'une élévation de la température. Lorsque les bulles vont occuper de 60 à 70% du volume total de la mousse suite à leur grossissement, elles vont alors se déformer et former des cellules polyédrales à paroi fine (Jeronimidis, 1988), bien qu'une forme purement polyédrique ne soit atteinte qu'au-delà d'une fraction volumique de gaz de 75% selon Walstra

(1989). Le drainage et la maturation d'Oswald conduisent donc tous deux à la transformation progressive des bulles sphériques en bulles polyédriques. Ainsi, un arrangement hexagonal parfaitement compact de sphères se transformerait théoriquement en une structure de cellules pentagonale-dodécaédrales d'après *Jeronimidis (1988)* (Figure I.22.). En pratique, une pareille régularité géométrique n'existe pas. La géométrie finale des bulles est donc plus ou moins régulière, avec une forte proportion de structures pentagonales-dodécaédrales et hexagonales-dodécaédrales.

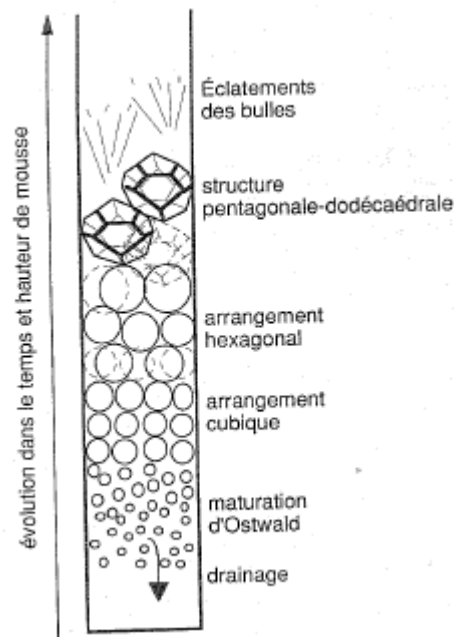


Figure I.22. Processus de déstabilisation d'une mousse : le drainage conduit à un compactage des bulles qui grossissent sous l'effet de la maturation d'Oswald. Les bulles, sous l'effet des contraintes stériques, perdent leur structure au profit d'une structure pentagonale-dodécaédrale (*Cayot, 1998*).

II.2.4.3. La coalescence

La coalescence est le résultat de la rupture d'un film inter-bulles. Deux bulles disparaissent pour en former une seule, plus grosse. La conséquence de ce phénomène est l'accroissement des tailles de bulles et la réduction de leur nombre. Ce phénomène est le moins bien connu et le moins étudié de l'ensemble des phénomènes de déstabilisation. Lorsque les films deviennent très fins, ils rompent, ce qui conduit à la coalescence des bulles voisines et à une réorganisation des bordures de Plateau. D'après *Bhakta (1997)*, le processus de coalescence dans les mousses est fortement couplé au drainage. Il a été étudié à partir de mesures acoustiques et de conductivité électrique (*Vandewalle, 2001a ; Vandewalle, 2001b*).

Lorsque la taille des bulles est grande, la rupture des films déclenche des phénomènes d'avalanches, collectifs et corrélés dans le temps, alors que le processus de destruction est plus progressif dans les mousses constituées de petites bulles. Le processus de rupture se déclenche lorsque la fraction volumique de gaz devient supérieure à une valeur seuil qui dépend du tensioactif et de sa concentration (*Bhakta, 1997*). Il semble que ce seuil corresponde à la dilatation maximale que les films peuvent supporter lors des réarrangements induits par le drainage. Il ne dépend pas de la taille des bulles, mais la durée de vie des mousses est d'autant plus grande que les bulles sont petites car le drainage est alors d'autant plus lent, ce qui retarde l'instant où ce seuil est atteint.

II.3. ROLE DES INGREDIENTS DANS LES PRODUITS FOISONNES

La stabilisation d'une mousse, comme celle d'une émulsion, est l'apanage du formateur qui définit la composition du produit et notamment les additifs à utiliser. La formulation joue en effet un rôle essentiel dans la stabilité d'une mousse. Globalement, il y a trois groupes d'ingrédients qui peuvent participer à la stabilisation :

- ✓ les *agents moussants*, notamment les protéines, qui s'adsorbent et stabilisent les interfaces ;
- ✓ les *agents épaississants* qui ont un effet « viscosifiant » ou « gélifiant » et contribuent à figer la phase continue ;
- ✓ les *gouttelettes de matière grasse* qui peuvent « s'adsorber » grâce à leur membrane, ou former un réseau qui « épaissit » la phase continue.

Le rôle du procédé sera alors de jouer sur les traitements mécaniques et thermiques afin de maintenir, voire développer les fonctionnalités de ces ingrédients.

II.3.1. Rôle des protéines en général et des protéines laitières en particulier

II.3.1.1. Aptitude des protéines au foisonnement

Un bon agent moussant est un composé qui diffuse rapidement vers l'interface (*Dickinson, 1989*) pour abaisser la tension interfaciale. Il s'agit donc d'un composé soluble et tensioactif, c'est-à-dire amphiphile et hydrosoluble dans le cas de mousses aqueuses. Ce composé doit avoir une hydrophobicité de surface importante (*Townsend & Nakai, 1983*) et

être flexible (*le Meste et coll., 1990*) pour former un film viscoélastique à l'interface (*Dickinson, 1989 ; Gekko & Yamagami, 1991*). La vitesse d'abaissement de la tension superficielle est ainsi corrélée au pouvoir moussant pour la caséine β et la sérum albumine bovine (*Graham & Philipps, 1976 ; selon Kinsella, 1984*), mais aussi pour d'autres protéines (*Kitabatake & Doi, 1982*). La caséine β , qui est la plus flexible des protéines laitières, s'adsorbe plus rapidement à l'interface et permet la formation rapide des bulles. La sérum albumine bovine s'étale plus lentement à l'interface et elle forme des bulles plus petites, l'expansion de la mousse étant toutefois plus longue (*Kinsella, 1984*).

En décomposant les courbes obtenues en tensiométrie au cours du temps, il est possible de décomposer le processus d'adsorption en trois phases (*McRitchie, 1991*) qui correspondent en gros à :

1. l'adsorption proprement dite ;
2. le compactage de la couche protéique en surface ;
3. les changements de conformation, de longue durée pour les protéines globulaires comme la β -lactoglobuline, et essentiels pour atteindre la valeur à l'équilibre de la pression de surface (*Song & Damodaran, 1987*).

Comme dans le cas des émulsions, le composé le plus tensioactif s'adsorbe en général préférentiellement à l'interface. Ainsi, la caséine β est principalement responsable du foisonnement (par injection d'air) d'une solution de caséine α_s et de caséine β (*Cayot, 1989*). La tensiométrie combinée à des mesures de réflexion de neutrons permet aussi l'étude de l'adsorption compétitive entre une protéine (caséine β , déplacée de l'interface) et un surfactant hydrosoluble ($C_{12}E_6$) à l'interface eau/air (*Dickinson, 1992a*).

L'hydrophobicité de surface et la flexibilité ne suffisent cependant pas à faire d'une protéine un bon agent moussant. Il faut encore qu'elle soit soluble et que son potentiel zêta ait une valeur optimale proche de ± 30 mV (*Bastien et coll., 1990*). En deçà de cette valeur, les protéines ont tendance à s'agglomérer et à perdre leur solubilité (au pI, $\zeta = 0$) ; au-delà, leur adsorption à l'interface est trop lente. De manière générale, à pH=6, 7 ou 8, et à 25, 55 ou 65°C, un caséinate de sodium donne une mousse plus abondante qu'un concentré de protéines sériques (*Morr & Ha, 1993*), ce résultat étant en accord avec ceux de *Patel et coll., (1988)*. Le foisonnement est d'autant plus important que la concentration en protéines est élevée. Cependant, pour ces deux mélanges protéiques, l'expansion de la mousse passe par des maxima de concentration distincts, autour de 5% pour les caséines et proche de 10% pour les isolats de protéines sériques (*Britten & Lavoie, 1992*).

II.3.1.2. Aptitude au foisonnement des protéines sériques

La capacité moussante des poudres de protéines sériques (concentrés de protéines sériques ou isolats de protéines sériques) varie selon leur origine commerciale (*Morr & Foegeding, 1990*). La capacité moussante dépend de la teneur en protéines, mais pourrait aussi être fonction de la teneur en minéraux, de la répartition entre les diverses protéines et aussi de leur degré de dénaturation. Il est cependant possible d'expliquer en partie ces variations à partir d'une méthode d'injection à l'azote et de mélanges modèles. Il a ainsi été démontré que les protéines sériques en mélange permettent un foisonnement identique à celui obtenu avec de l' α -lactalbumine pure et supérieur au cas de la β -lactoglobuline seule, quel que soit le pH (*Closs, 1990*). La répartition entre les diverses protéines pourrait donc influencer l'aptitude au foisonnement de ces poudres de protéines sériques dispersées dans l'eau. Dans tous les cas, la présence de matière grasse diminue l'aptitude d'une poudre à former des mousses (*Dickinson, 1992 ; Clark, 1995*). Ainsi, *Charbonnel et coll., (1994)* ont montré que l'utilisation de concentrés de protéines sériques dégraissés améliore les propriétés de foisonnement et de stabilisation de la mousse provenant des mélanges protéiques (*Cayot & Lorient, 1998*).

II.3.2. Rôle des agents stabilisants

Pour produire une mousse stable, il n'est pas suffisant de disposer de bons agents moussants à la surface des bulles, mais il est également essentiel de contrôler la rigidité et/ou la viscosité élevée de la phase continue (*Gaucheron, 2004*). Les agents stabilisants, épaississants et/ou gélifiants sont donc utilisés dans les produits alimentaires pour plusieurs raisons, dont deux principales : ce sont de puissants modificateurs de texture et ils permettent d'augmenter fortement la stabilité dans le temps des aliments élaborés.

Ce sont souvent des biopolymères de type polysaccharides : agar, alginates, amidon, gomme arabique, guar, pectine, xanthane..., à l'exception de la gélatine qui est une protéine et qui reste l'hydrocolloïde le plus universellement utilisé dans l'industrie agroalimentaire à ce jour. Grâce à leurs propriétés épaississantes, les polysaccharides augmentent la viscosité de la phase aqueuse, ce qui augmente la stabilité de la phase gaz en ralentissant les mouvements des bulles de gaz et donc à la fois le crémage et le drainage (*Stanley et coll., 1995*). Une attention particulière sera accordée au xanthane puisque nous l'avons utilisé dans ce travail.

II.3.2.1. Xanthane

Le xanthane est obtenu par la fermentation de sucres par la bactérie *Xanthomonas campestris*. C'est un exopolysaccharide ayant un poids moléculaire très élevé (entre 10^3 - 10^4 kDa). La chaîne principale est formée de molécules de D-glucose sur lesquelles sont branchées des chaînes latérales. La présence d'acide glucuronique et d'acide pyruvique confère au xanthane un caractère anionique marqué. Dans les milieux alimentaires, ces fonctions acides sont neutralisées par les cations Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} . Toutefois, le xanthane est un biopolymère qui est chargé négativement dans la gamme habituelle de pH et peut donc présenter des interactions électrostatiques avec des protéines (Syrbe et coll., 1998).

Le xanthane est un épaississant soluble à froid en raison du degré de branchement élevé et des charges répulsives des groupements acides. En présence d'électrolytes, les molécules de forme hélicoïdale (simple ou doubles hélices) peuvent être assimilées à des bâtonnets rigides qui n'ont pas tendance à s'associer entre eux (Capron et coll., 1997 ; Rodd et coll., 2000). Ceci explique la rigidité des chaînes de xanthane et la faiblesse du réseau entre les macromolécules qui n'impliquent que des liaisons hydrogène.

Ainsi, les solutions de xanthane présentent un comportement rhéofluidifiant avec un seuil d'écoulement qui leur confère un pouvoir de suspension ; au-delà du seuil, l'écoulement du produit est facile. Sa viscosité est élevée et dépend peu de la température, tant que la température de transition (70 à 80°C) n'est pas atteinte car les bâtonnets restent peu déformables. Il faut mentionner que le xanthane est le seul polysaccharide alimentaire qui présente un seuil d'écoulement. Des particules dispersées dans une solution ont naturellement tendance à décanter ou à flotter ; le seuil d'écoulement s'oppose à ces mouvements. Les particules restent donc réparties de façon homogène après dispersion. Le xanthane est compatible avec certains autres polysaccharides ; en particulier, il développe des synergies avec le guar, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité. Il est stable en milieu acide et il ne précipite pas en présence de concentrations élevées de sels (comme une saumure à 250 g/L).

Enfin, le xanthane, par sa mise en œuvre à froid, son seuil d'écoulement, sa résistance à l'acidité, sa viscosité à chaud est le texturant de choix des sauces (mayonnaise, sauce salade...). Alors qu'une mayonnaise classique contient 80% d'huile, une sauce allégée industrielle contient parfois moins de 30% d'huile : il faut remplacer l'huile manquante par de l'eau « texturée ». Egalement dans l'agroalimentaire, Laneuville-Ballester (2004) ont étudié la

fonctionnalité des complexes xanthane/ β -Lg, comme substitut de matière grasse, dans des formulations modèles de garniture à biscuit ou de glaçage à gâteaux. Les résultats de ce même auteur démontrent que l'utilisation de complexes xanthane/ β -Lg peut être adaptée pour obtenir diverses textures en ajustant leur niveau d'hydratation. Ainsi, des produits allégés en graisses qui possèdent des profils de texture et de viscosité se rapprochant de ceux des produits témoins (contenant de la matière grasse) ont été obtenus.

Afin de mieux comprendre le rôle de la structuration de la phase continue et des interfaces dans le cas des mousses allégées en matière grasse, l'utilisation du xanthane en tant que seul épaississant accompagné par des assemblages protéiques pourrait être également envisagée pour la substitution de la matière grasse.

II.3.3. Rôle des sucres courts

Les sucres courts (notamment le lactose et le saccharose) constituent une fraction importante de la matière sèche des desserts lactés. Selon le *Meste et coll., (2002)*, les sucres sont les substances les plus utilisées pour stabiliser les protéines. Toutefois, aux concentrations élevées, ces sucres ont comme autre effet de diminuer la solubilité des protéines par un effet de « salting-out », ce qui réduit leur aptitude à former des mousses. Lors d'une étude sur la stabilité des systèmes aérés contenant du blanc d'œuf en concentration constante et du sucre à des pourcentages variés (50%, 60%, 70%), *Lau & Dickinson (2004)* ont montré que les échantillons contenant 70% ou plus de sucres totaux étaient visiblement stables (pendant au moins 2 heures après la préparation), sans aucune indication significative de crémage ou de drainage, alors que les échantillons préparés avec 50% de sucres totaux étaient clairement instables. De plus, la stabilité des échantillons préparés avec un niveau intermédiaire de 60% de sucres totaux, s'avérait être aussi bien influencée par la concentration en protéines que par le temps d'aération, avec une stabilité améliorée à des concentrations plus élevées en protéines et pour un temps d'aération plus long. Par conséquent, ces mêmes auteurs ont conclu que la réduction de la concentration en sucre dans un tel système aéré accélérerait le processus de déstabilisation de la mousse. En général, les échantillons avec une teneur en sucres totaux de moins de 60% présentaient un drainage rapide du liquide.

Lomakina & Miková (2006) ont montré que la présence du sucre retarde la formation de la mousse et diminue la capacité foisonnante des solutions à base de protéines de blanc d'œuf surtout pendant la première partie du battage. Il a été établi que la présence de sucre

peut affecter la thermodynamique et les propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires, notamment leur adsorption et leur comportement à l'agrégation (*Dickinson & Matia-Merino, 2002*). Selon *Lau & Dickinson (2004)*, l'ajout de sucre conduit à une augmentation de la viscosité de la phase continue, ce qui constitue un désavantage pour l'incorporation de l'air ainsi que pour la diffusion rapide et le déplissement des protéines dans le voisinage de l'interface.

De plus, *Antipova et coll. (1999)* ont rapporté que l'adsorption de l'ovalbumine diminue en présence de saccharose, peut-être parce que l'ovalbumine forme des liaisons hydrogène avec les molécules de sucre, ce qui entraîne une augmentation de son hydrophobicité et diminue son activité de surface. De ce fait, les molécules d'ovalbumine qui participent à la formation de liaisons hydrogène avec du saccharose vont de préférence rester dans la phase continue plutôt que de s'adsorber à l'interface.

Enfin, *Raikos et coll. (2007)* ont démontré que les échantillons contenant un pourcentage significatif de saccharose sont beaucoup plus stables par rapport aux autres échantillons. Cette augmentation de la stabilité de la mousse qui a été observée pour les échantillons contenant des niveaux élevés de saccharose peut être attribuée à l'effet du sucre sur la viscosité de la phase continue. Le sucre contribue en effet à la stabilité de la mousse en augmentant la viscosité de l'eau dans les films lamellaires et, par conséquent, en retardant le drainage (*Lau & Dickinson, 2004*).

II.3.4. Rôle stabilisant de la matière grasse dans les émulsions foisonnées

Le rôle de la matière grasse dans les émulsions foisonnées est complexe et encore mal compris, mais les résultats de différents travaux de la littérature ont montré l'importance majeure de deux phénomènes sur la stabilité d'une émulsion foisonnée :

- ✓ l'adsorption des globules gras aux interfaces eau-air ;
- ✓ la coalescence partielle des globules gras.

D'après *Kalnin et coll. (2004)*, les cristaux de matière grasse jouent un rôle équivalent aux protéines et peuvent stabiliser les bulles d'air d'une émulsion foisonnée. Cette fonctionnalité supplémentaire des globules gras influence directement la stabilité, la fermeté et la texture des mousses. Toutefois, pendant le foisonnement de la crème fouettée, *Brooker (1993)* a montré que l'adsorption des globules gras aux interfaces n'intervient que dans un second temps et qu'elle est plutôt de type non-compétitive : tout d'abord, les bulles d'air sont stabilisées par

l'adsorption des protéines à l'interface eau/air, l'adsorption des globules gras ne devenant significative que par la suite.

Différents travaux de la littérature ont démontré l'importance sur la stabilité des mousses du phénomène *d'adsorption des globules gras aux interfaces eau/air* (Figure I.23.). La présence d'interactions bulles/globules se traduit par une structuration supplémentaire de l'émulsion foisonnée qui augmente à la fois la masse volumique apparente de la bulle, ainsi que la viscosité et le caractère viscoélastique de la phase dispersante, ce qui peut favoriser la stabilisation de la phase gazeuse dans la phase continue (réduction du crémage et du drainage) (Labbafi, 2006).

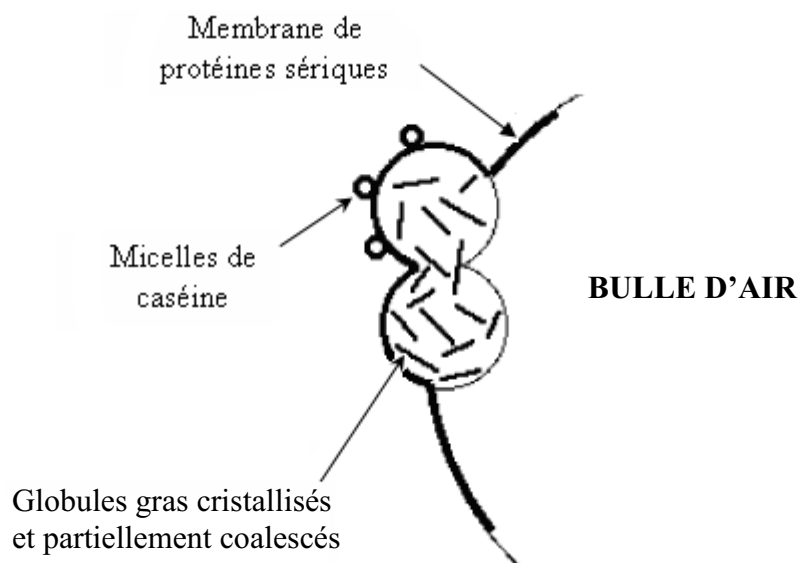


Figure I.23. Représentation schématique d'une interface eau/air dans une émulsion (Eisner et coll., 2005).

Selon la littérature, la réussite du foisonnement d'une émulsion dépend également de la *coalescence partielle contrôlée* et de la *cristallisation de la matière grasse*. Le phénomène de coalescence partielle dans les émulsions H/E est principalement induit par le cisaillement lorsque le film protéique interfacial qui protège les globules gras est rompu. Ce phénomène se produit quand la matière grasse présente dans la formulation est partiellement cristallisée. Puisque celle-ci ne s'écoule pas, le processus de coalescence reste incomplet : on parle de coalescence partielle (Leser & Michel, 1999). En pratique, il s'agit d'une fusion partielle de cristaux de globules gras situés en paroi de plusieurs globules, mais qui ne s'accompagne pas d'une fusion de la totalité des globules concernés. Il en résulte la formation d'un réseau tridimensionnel dans lequel les globules forment des chaînes et des *clusters* au sein de la phase continue. Ce réseau stabilise non seulement la phase grasse dispersée dans la phase

aqueuse, mais il modifie également la rhéologie de l'émulsion et peut piéger les bulles (Pillhofer et coll., 1994).

Par conséquent, la structure de l'émulsion foisonnée dépendra d'une part de sa formulation (nature de la matière grasse...) et d'autre part de l'interaction formulation/procédé et en particulier des traitements thermiques appliqués. Même en tenant compte des développements les plus récents, on connaît encore peu de choses sur le rôle des différents additifs, ainsi que sur l'impact des variables du procédé sur ce phénomène d'un point de vue quantitatif.

Toutefois, les consommateurs se tournent actuellement vers les produits allégés en matière grasse, aérés (mousses laitières, mousses de fruit...), présentant des propriétés nutritionnelles intéressantes. Ces produits présentent un défi au niveau de leur conception : il faut compenser la diminution en matière grasse par un ajout d'additifs permettant d'avoir une viscosité suffisante pour foisonner ou bien fabriquer des assemblages protéiques capables de stabiliser les matrices formées. L'utilisation ces assemblages protéiques afin de réduire la teneur en matière grasse des aliments tout en leur assurant de bonnes caractéristiques organoleptiques s'avère très intéressante pour les industriels qui pourraient ainsi satisfaire des consommateurs qui sont de plus en plus sensibilisés à l'importance d'une alimentation saine.

En conclusion, il semble clair que la formulation occupe une place incontournable dans la formation des produits foisonnés car elle conditionne les interactions entre les différents ingrédients (protéines de lait, hydrocolloïdes, sucre,...) et les interactions entre ces ingrédients et les bulles d'air. La stabilité des produits foisonnés est également assurée par l'incorporation d'ingrédients qui jouent un rôle clef sur les propriétés de la phase continue, notamment sur ses propriétés viscoélastiques. La formulation joue donc un rôle essentiel dans la fabrication des mousses alimentaires, mais c'est le procédé qui permet la formation de microstructure de la mousse. Si l'influence des paramètres du procédé reste mal comprise à ce jour, c'est sans doute à cause de l'interaction formulation/procédé qui rend l'effet de ces paramètres fortement dépendant de la formulation.

II.3.5. Intérêt de la dénaturation et de l'agrégation des protéines dans le foisonnement

L'amélioration des propriétés moussantes des protéines de lait et plus particulièrement des isolats de protéines sériques (WPI) représente un objectif clef de l'industrie laitière depuis plusieurs décennies. En effet, la stabilité, la texture, l'aspect et la consistance d'une gamme variée de produits foisonnés utilisant les protéines sériques pourraient être améliorés si les

propriétés fonctionnelles des protéines sériques étaient mieux valorisées. De plus, l'amélioration des capacités moussantes pourrait fortement diminuer les quantités d'agents moussants nécessaires pour atteindre les caractéristiques demandées par le producteur. Côté laitier, la diminution des tonnages serait alors compensée par l'augmentation de la valeur ajoutée induite par ces ingrédients améliorés.

L'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines peut être réalisée en modifiant la structure de la protéine par des traitements chimique, enzymatique, mécanique et thermique. Il est bien connu que les modifications physiques sont les plus simples car elles n'impliquent aucune modification de la structure primaire de la molécule : seules la structure tridimensionnelle et les interactions intermoléculaires sont modifiées lorsqu'on soumet les protéines à différentes conditions environnementales (température, pression, force ionique, pH, etc.). L'application de traitements thermiques est en général exigée pour des raisons de sécurité alimentaire, mais ces traitements conduisent également le plus souvent à la dénaturation et à l'aggrégation des protéines. Pour une modification optimale des propriétés fonctionnelles, il est donc essentiel que les conditions environnementales soient soigneusement contrôlées (*Dickinson & McClements, 1996*).

Dans l'abondante littérature existante sur le traitement thermique appliqué à la β -lactoglobuline (β -Lg), la principale protéine des WPI, les données expérimentales soulignent qu'une première étape de dissociation des dimères et de formation de monomères se produit à des températures entre 68 et 75°C. En augmentant la température et le temps du traitement, la présence des dimères et d'autres oligomères a été observée. Enfin, lorsque la température de traitement est supérieure à 75°C, la présence simultanée des polymères et des copolymères de β -Lg/ α -La a été signalée. La proportion monomères/polymères dépend fortement du pH et de la température du traitement thermique. Ces paramètres doivent être ajustés pour produire un niveau de dénaturation adéquat et obtenir un degré de polymérisation satisfaisant afin de fournir une rigidité et une cohésion suffisantes au film interfacial au cours de la formation de la mousse. Ceci doit être atteint sans toutefois promouvoir la formation d'agglomérats protéiques résultant d'une dénaturation excessive qui se traduit en général par une perte de fonctionnalité des protéines (*Tosi et coll., 2007*). La littérature montre d'abord que la capacité de la β -Lg à former des mousses pourrait être renforcée par dénaturation (*Lee, Morr & Ha, 1992*). Selon *Phillips & Kinsella (1990)*, un déplissement partiel de la molécule de protéine et l'exposition des groupes hydrophobes accroît les interactions hydrophobes et favorise la formation de la mousse. De même, la stabilité de la mousse devrait être renforcée par

l'adsorption des fractions protéiques insolubles qui ralentiraient l'amincissement des films par des effets stériques (Walstra & de Roos, 1993). En revanche, l'agrégation par traitement thermique et la polymérisation des protéines de lactosérum conduisent également à une détérioration des propriétés des mousses (Richert, Morr & Cooney, 1974) parce que les changements conformationnels induits par chauffage ont pour effet de diminuer la solubilité des protéines, ce qui diminue la proportion de protéines disponibles pour stabiliser les interfaces gaz-liquide. Il semblerait que dans le cas des solutions de WPI contenant à la fois des protéines sous forme de monomères et polymères, les monomères contribuent à une diminution rapide de la tension interfaciale (ce qui augmente leur capacité à former une mousse), alors que les polymères contribuent à la viscoélasticité du film (ce qui améliore la stabilité de la mousse). Lorsque seuls les polymères sont présents dans la solution de protéines (cas des WPI chauffées à 90°C pendant 20 min), ceux-ci ne s'adsorbent que lentement aux interfaces eau-air à cause de leur faible coefficient de diffusion au cours d'un bullage (Zhu & Damodaran, 1994).

Jusqu'à présent, plusieurs auteurs (Zhu & Damodaran, 1994; Leman & Dogan, 2004; Davis & Foegeding, 2004) ont tenté de corréler quantitativement l'effet de la dénaturation et de l'agrégation thermique des protéines de lactosérum aux propriétés des mousses, mais ces relations sont encore loin d'être bien comprises. Par exemple, Zhu & Damodaran (1994) ont vérifié que les traitements thermiques doux amélioraient les propriétés moussantes des protéines sériques, tandis que des conditions de chauffage plus agressives conduisaient à une diminution de ces propriétés. En fait, la structure et les propriétés fonctionnelles des agrégats induits par traitement thermique dépendent de nombreux facteurs, y compris la température de chauffage, la concentration en protéines ou encore la force ionique (de la Fuente, Singh & Hemar, 2002).

Comme cela a déjà été dit précédemment, la transition des protéines natives vers l'état dénaturé implique des nombreux changements conformationnels dans les structures secondaire, tertiaire et quaternaire, ainsi que des modifications au niveau des liaisons, telles que les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, les liens électrostatiques et les ponts disulfures. Par exemple, il a déjà été prouvé que ces modifications structurales des protéines gouvernent la microstructure et la texture des gels de protéines sériques (Ker & Toledo, 1992). Concernant les propriétés moussantes, Zhu & Damodaran (1994) ont également montré que la proportion de monomères/polymères formés par le traitement thermique dans une solution de WPI joue un rôle crucial sur les propriétés de la mousse. Ces mêmes auteurs ont signalé que les monomères contribuent à la formation de la mousse, mais que les films

protéiques formés par les espèces de type monomériques ne semblent pas fournir les propriétés viscoélastiques nécessaires à la stabilisation des mousses, alors que les polymères contribuent plutôt à la stabilité de la mousse. De même, *Leman & Dolgan (2004)* ont fait valoir que, selon le degré de dénaturation des protéines et la nature des arrangements des protéines suite au traitement thermique, les mousses de protéines sériques diffèrent en termes d'aire interfaciale, mais aussi de résistance mécanique, ainsi que par leur viscoélasticité et par leur capacité de rétention de l'eau. Toutefois, dans tous les travaux mentionnés ci-dessus, les fractions protéiques dénaturées et agrégées ont toujours été obtenues à l'aide de traitements thermiques statiques qui diffèrent significativement des traitements dynamiques appliqués dans l'industrie alimentaire au niveau des échangeurs de chaleur, tels que la pasteurisation « high temperature short time » (HTST) ou la stérilisation « ultra-high temperature » (UHT). À l'heure actuelle, il existe très peu d'informations disponibles sur l'interaction entre d'une part les mécanismes physico-chimiques de dénaturation/agrégation des WPI et d'autre part l'hydrodynamique dans les échangeurs de chaleur. En outre, on sait encore peu de choses sur l'impact du caractère dynamique du traitement thermique sur le rôle des agrégats protéiques dans la formation d'une mousse à base de WPI. De même, l'effet dynamique du traitement thermique sur les propriétés physico-chimiques des mousses reste encore en grande partie inconnu.

II.4. ASPECTS TECHNOLOGIQUES DU PROCEDE DE FOISONNEMENT

II.4.1. Introduction

Si l'on considère les procédés qui permettent de former une mousse à partir d'une dispersion mécanique de la phase gaz, on constate qu'il existe deux catégories de méthodes permettant de réaliser l'opération de foisonnement à l'échelle industrielle : l'une fondée sur des systèmes de dispersion statiques et l'autre reposant sur une dispersion par des systèmes mécaniques rotatifs. On peut superposer sur cette classification une seconde qui oppose procédés continus et discontinus (ou batch). En fait, tous les procédés batch couramment employés mettent en jeu des systèmes mécaniques tournants, le simple bullage du gaz en l'absence d'agitation étant plutôt réservé aux analyses en laboratoire.

D'un point de vue technologique, nous avons donc préféré le classement suivant :

- les procédés discontinus de battage ;
- les procédés continus :

- le mélangeur rotor-stator (système rotatif) ;
- l'échangeur à surface raclée (système rotatif) ;
- les technologies prometteuses, des plus courantes aux plus originales :
 - les mélangeurs statiques ;
 - les techniques membranaires (dispersion statique).

En pratique, la dispersion-stabilisation d'une phase gaz ne constitue qu'une étape dans la préparation d'une mousse alimentaire. Comme dans tout procédé, elle peut en être une étape clef, voire l'étape *limitante*. Toutefois, elle ne peut bien souvent être envisagée qu'en synergie avec les étapes amont et aval.

II.4.2. Matériels et aspects technologiques du procédé d'aération discontinu

Les résultats obtenus avec les deux techniques d'aération en discontinu, à savoir le fouettage et le bullage, ne sont pas comparables car elles ne relèvent pas du même type de dénaturation, les énergies mises en jeu étant différentes (*Cayot & Lorient, 1998*). Il semble cependant que la technique par bullage soit plus reproductible d'un laboratoire à l'autre, permettant ainsi une meilleure comparaison des résultats (*Kinsella, 1984*), même si elle n'est pas utilisable pour la production à l'échelle industrielle.

II.4.2.1. Méthode par battage (ou fouettage)

Le battage (ou le fouettage) est la manière traditionnelle de fabriquer une mousse à partir de blanc d'œuf, de protéines de lait ou de crème. De l'air est piégé dans le liquide visqueux sous forme de grosses bulles qui sont ensuite fragmentées en bulles plus petites par une action mécanique. En principe, il y a une quantité illimitée d'air disponible pour l'incorporation, mais en pratique, le foisonnement est limité par le fait qu'on ne peut plus augmenter la quantité d'air incorporé une fois que l'ustensile de battage est couvert de mousse.

Le fouettage comporte plusieurs étapes. Pendant la première étape (quelques secondes), une grande quantité d'air est introduite et le taux de foisonnement augmente rapidement. Ensuite, il y a une réduction de la taille moyenne des bulles, sans modification du taux de foisonnement. Si le fouettage est arrêté, les grosses bulles montent à la surface et disparaissent, alors que les petites bulles restent dans la mousse. Pendant la deuxième étape,

des bulles sont incorporées dans une mousse stable et le taux de foisonnement reste presque inchangé.

L'agitation pendant le battage provoque des variations locales de pression qui entraînent à leur tour des variations de tension superficielle aux interfaces dues à la fois à la déformation des interfaces et au fait que la rupture des bulles est souvent asymétrique. Au-delà d'une certaine vitesse de battage, les variations de tension superficielle deviennent si intenses que les films liquides entre les bulles en vibration se rompent et que la mousse s'effondre.

Le mécanisme responsable de la diminution du taux de foisonnement après un temps spécifique de battage, appelé également « surbattage », est connu depuis longtemps (*Halling, 1981; Kinsella, 1981*). D'après *Raikos et coll. (2007)*, le surbattage dû à des périodes prolongées de battage conduit à une coagulation excessive des protéines globulaires aux interfaces, ce qui est associé à la formation d'agrégats insolubles. Ces agrégats manifestent une faible capacité de rétention de l'eau qui serait en partie responsable de l'effondrement de la mousse. Ceci est reflété par la baisse du taux de foisonnement (*Dickinson, 1996*). Une autre interprétation possible correspond à une désorption des protéines suite à un battage trop intense ou trop prolongé ; on notera qu'elle n'est pas incompatible avec la formation d'agrégats aux interfaces décrite précédemment.

Le battage est de fait la méthode la plus largement utilisée comme procédé de foisonnement pour la caractérisation des mousses élaborées à l'échelle du laboratoire (*Bouaouina, 2005 ; Raikos et coll., 2007 ; Thakur et coll., 2006 ; van der Plancken et coll., 2007*). La plupart des travaux de la littérature concernant le foisonnement sont des travaux réalisés en systèmes batch visant à améliorer la compréhension des effets de formulation et des phénomènes interfaciaux sur la formation et la stabilisation des mousses. Ils ont été réalisés principalement sur des fluides modèles ou des émulsions (*Brooker et coll., 1986 ; van Aken, 2001 ; Rouimi et coll., 2005*). Ces études restent cependant éloignées des conditions industrielles.

II.4.2.2. Méthode par bullage

Le problème actuel pour l'analyse des mousses réside dans la difficulté de former et d'analyser la mousse sur un même appareil. La plupart des appareils permettant d'analyser la structure de la mousse nécessitent la formation de celle-ci suivant un protocole défini, puis son transvasement vers une cellule d'analyse. L'outil employé lors des analyses par bullage

permet, par son principe de fonctionnement, la formation et le suivi de différents paramètres caractérisant la mousse dans une même cellule et donc en simultané.

La technique de bullage consiste donc dans l'injection d'un gaz dans la solution au travers d'un fritté sur lequel repose un volume connu d'échantillon. Le flux d'air, réglable au moyen d'un débitmètre – et filtré au préalable – assure un bullage homogène au travers du fritté, permettant ainsi une formation reproductible de la mousse. Quant au volume de mousse présent dans la colonne, il est déterminé optiquement par transmission de la lumière. La mesure de la conductivité avec pour référence la conductivité du tampon permet de calculer le volume de liquide drainé dans la mousse au cours du temps. Plus le foisonnement est important, plus la quantité d'eau entre les bulles est faible, plus la conductivité chute. Ensuite, la conductivité augmente au fur et à mesure du drainage jusqu'à retrouver la valeur correspondant à la solution non gazéifiée.

Afin de conclure sur les techniques d'aération en discontinu, il a été démontré que les résultats obtenus pour des concentrés de protéines sériques par une méthode utilisant le bullage ne peuvent être donc pas comparés à une méthode par battage (*Haggett, 1976* ; selon *Kinsella, 1984*). Fabriquer une mousse par battage, décompression ou introduction de bulles par un jet d'air ne relève pas du même type de dénaturation, les énergies mises en jeu étant différentes. En outre, les concentrations protéiques utilisées sont très différentes. Enfin, par bullage, on obtient une mousse liquide alors que, par battage, on effectue la mesure sur une mousse semi-solide ou du moins ferme dans son aspect. Tandis que le bullage permet aux protéines de migrer à l'interface et de former un film dans des conditions assez voisines de la tensiométrie, le battage accélère ces phases du processus d'abaissement de la tension interfaciale, mais provoque surtout un déplissement et une dénaturation des protéines beaucoup plus prononcés (*Kinsella, 1984*) en raison du cisaillement important.

II.4.3. Matériels et aspects technologiques du procédé continu de foisonnement

II.4.3.1. Le système rotor-stator

On appelle classiquement « rotor-stator » un système mécanique rotatif non raclant à faible entrefer, c'est-à-dire pour lequel la distance entre la partie statique (le « stator ») et la partie mobile (le « rotor ») est faible devant la dimension de l'ensemble. En pratique, un grand nombre de systèmes d'agitation correspondent à cette définition, mais on attribue

généralement cette dénomination uniquement aux systèmes équipés de dents. On peut distinguer les systèmes axiaux des systèmes radiaux (Figure I.24.). Les systèmes radiaux sont plutôt utilisés pour l'émulsification en continu, alors que les systèmes axiaux sont préférés pour le foisonnement en continu. Les systèmes rotor-stator radiaux sont donc les plus répandus pour la production industrielle de mousses dans l'industrie alimentaire puisqu'on les rencontre dans des secteurs aussi variés que les préparations charcutières, la pâtisserie ou les desserts lactés, à l'exception des crèmes glacées (*Russell et coll., 1999*). Le gaz est généralement injecté en amont de la tête par un simple orifice sans véritable pré-dispersion. Toutefois, la géométrie des unités rotor-stator reste complexe. Les paramètres géométriques sont donc nombreux : en plus du diamètre du rotor et de celui du stator, il s'agit du nombre de rangées de dents, du nombre de dents par rangée, mais également de la longueur des dents, de leur largeur et leur hauteur, ainsi que de la distance axiale entre les rangées de dents.

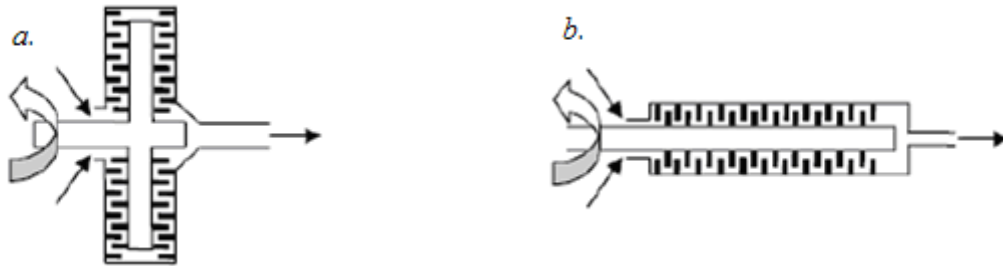


Figure I.24. Schéma de principe des systèmes rotor-stator : a) système radial, b) système axial (*Labbafi, 2006*).

Les unités rotor-stator sont des systèmes qui ont été peu étudiés dans la littérature, notamment du point de vue théorique. Jusqu'à présent, les seules informations disponibles dans la littérature sur le mélange et la dispersion de gaz dans les systèmes rotor-stator à dents axiaux ont été fournies par *Kroezen et coll. (1988)*, *Windhab (1991)*, *Hanselmann & Windhab (1999)* ainsi que celle de *Müller-Fischer et coll. (2007)*. D'un point de vue qualitatif, la force motrice du foisonnement est la puissance dissipée par l'agitation qui est a priori bien supérieure à celle engendrée par l'écoulement axial pour les produits visqueux.

Du point de vue du foisonnement, les performances des unités rotor-stator sont correctes en régime laminaire, meilleures en régime turbulent, mais très médiocres dans la région de transition entre ces régimes (*Kroezen et coll., 1988*). Concernant les paramètres opératoires du foisonnement, les temps de passage sont usuellement inférieurs à la minute, même sur les équipements les plus gros de type rotor-stator. La vitesse de rotation de la tête peut la plupart du temps être augmentée linéairement jusqu'à 2000 tours/min. Elle permet

d'accroître la puissance dissipée, ce qui favorise en général la formation de bulles plus petites. C'est pourquoi les vitesses élevées (vers 1500 tours/min.) sont la règle dans l'industrie. Une pression de fonctionnement de l'ordre de 2 à 3 bars, joue en général un rôle positif sur le foisonnement. En revanche, le contrôle de la température constitue la principale faiblesse des unités rotor-stator : bien qu'équipés d'une double-enveloppe, les temps de passage courts et la géométrie de la tête ne permettent pas un transfert de chaleur efficace, le système de refroidissement servant principalement à limiter l'échauffement du produit foisonné et à maintenir une température en sortie acceptable. Ce système ne permet donc pas d'éviter les échauffements locaux qui peuvent être importants dans ces foisonneurs (*Balerin et coll., 2007*).

En conclusion, on retiendra que les mélangeurs de type rotor-stator sont les plus répandus pour réaliser l'opération de foisonnement dans les industries agroalimentaires, mais qu'ils sont peu flexibles puisque la géométrie est imposée et admet peu de variantes. Globalement, leur mise en œuvre reste fondée sur un savoir-faire empirique et les critères d'extrapolation sont encore mal définis. *Kikuchi et coll. (1995)* ont également signalé l'apparition d'instabilités de fonctionnement lors d'un changement de conditions opératoires pour des produits à taux de foisonnement élevé : celles-ci se traduisent par l'apparition d'oscillations cycliques de la pression de fonctionnement et du taux de foisonnement.

II.4.3.2. Une alternative: l'échangeur à surface raclée (ESR)

Les échangeurs à surface raclée ont rapidement trouvé leur application dans les industries alimentaires. Ils ont été aussi utilisés pour le chauffage ou le refroidissement de fluides visqueux dans l'industrie chimique (tels que les colles, les graisses, les cires ou les crèmes), et également pour la séparation par cristallisation en chimie et pétrochimie.

Malgré l'importance du foisonnement de la crème glacée, l'utilisation des ESR comme foisonneur industriel est restée en retrait par rapport aux systèmes rotor-stator à dents, bien que leur aptitude à produire des émulsions foisonnées ait été démontrée dans de nombreux cas, tels que ceux des mousses de foie de volaille, de fruits et de légumes.

De point de vue technologique, les ESR sont constitués de deux tubes coaxiaux, comme on peut le voir sur la Figure I.25. Le produit à traiter s'écoule dans le tube intérieur qui est agité par un rotor axial équipé d'un nombre variable de lames capables de racler la paroi. Le fluide thermique (liquide froid ou chaud, vapeur d'eau, fluide frigorigène) circule à co- ou à contre-courant dans l'espace annulaire entre les deux tubes.

Globalement, on retiendra que, hors le cas de la crème glacée, l'utilisation des ESR reste encore marginale dans le domaine du foisonnement, bien que leur aptitude à conduire le foisonnement ne soit plus à démontrer. En effet, *Labbafi et coll. (2005)* ont montré que dans le secteur agroalimentaire ce type de système constitue une alternative intéressante au système standard rotor/stator.

Les paramètres opératoires sont les débits gaz et produit, la vitesse d'agitation du rotor, la pression opératoire, ainsi que la température d'entrée de la phase liquide et du fluide thermique. Concernant ce dernier point, *González-Méndez (1990)* a proposé une méthode alternative fondée sur l'utilisation de trois ESRs en série : le premier sert à pré-disperser le gaz à chaud, alors que les suivants assurent à la fois la dispersion et le refroidissement qui permet de figer la structure. Cette méthode fondée sur l'emploi de plusieurs foisonneurs à l'avantage d'assurer le foisonnement de matières premières très visqueuses.

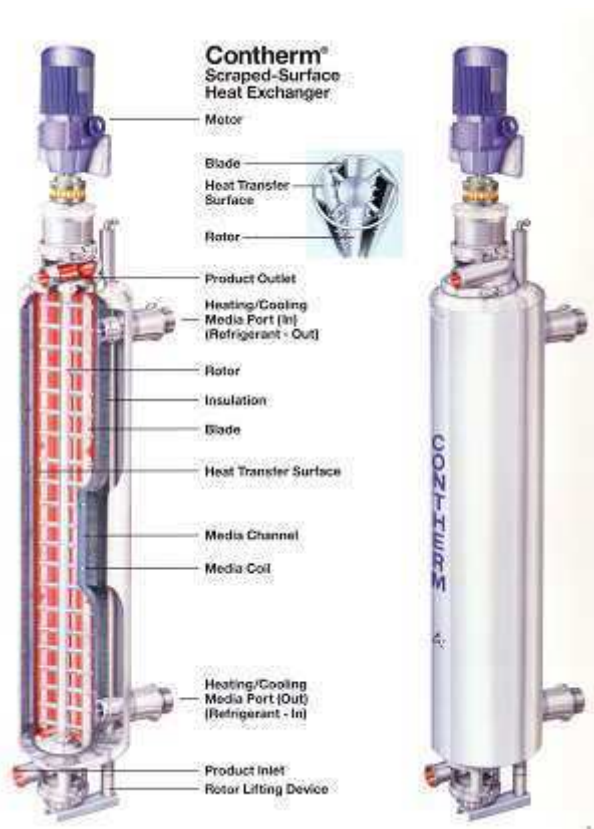


Figure I.25. Schéma complet d'un échangeur à surface raclée (modèle Alfa-Laval)

(www.genemco.com).

En considérant des paramètres opératoires tels que la pression d'opération, la vitesse d'agitation et le temps de séjour sur les qualités de la mousse (taux de foisonnement, qualité

de la distribution de la taille des bulles, texture et stabilité) et en la reliant à la puissance dissipée, l'ESR s'avère posséder un comportement global proche d'une unité rotor/stator et permettre une réduction supplémentaire de la taille moyenne des bulles.

En résumé, les principaux avantages des ESRs sont la flexibilité de leur design qui permet d'obtenir des systèmes « sur mesure » adaptés à chaque application, ainsi que la possibilité de conduire simultanément le foisonnement et un traitement thermique sévère. Quant à leurs inconvénients, ils résident essentiellement dans le fait que les ESRs ont une hydrodynamique complexe, caractérisée par un grand nombre de transitions de régime, celles-ci dépendant fortement des éléments géométriques du mélangeur, ce qui rend difficile l'extrapolation de ce type de technologie.

II.4.3.3. Une technologie encore sous-exploitée : les mélangeurs statiques

Les mélangeurs statiques (Figure I.26.) jouent un rôle important dans les industries de transformation. Ils sont utilisés notamment dans les industries chimiques et alimentaires. Pour ces dernières, ils conviennent particulièrement au mélange des additifs, comme des assaisonnements, des émulsifiants et des conservateurs. Cette technologie est déjà employée dans l'industrie alimentaire pour le foisonnement du beurre et des fourrages de biscuits. En principe, le terme « mélange statique » traduit un mélange sans agitation mécanique : c'est l'écoulement du fluide lui-même qui engendre le mélange. En pratique, leurs faibles volumes, la maintenance réduite nécessaire, leur installation simple, leur adaptabilité et leur excellente fiabilité sont les principaux atouts des mélangeurs statiques (*brochure Sulzer Chemtech. Mixing and reaction technology; www.sulzerchemtech.com*). En résumé, il s'agit d'obstacles de géométrie définie, appelés *éléments*, ajoutés en série dans une conduite cylindrique qui étaient initialement destinés à améliorer le mélange en phase homogène des fluides. Il en existe maintenant plus d'une centaine de modèles brevetés dont à peine une trentaine sont réellement commercialisés. Tous sont disponibles dans une grande variété de matériaux. Globalement, les mélangeurs statiques ont trouvé depuis une multitude d'applications dont les principales ont été résumées par *Thakur et coll. (2003)*. Ces auteurs ont également listé les principaux modèles actuellement commercialisés. Les applications comme « disperseurs statiques » de gaz sont récentes et ont principalement concerné le domaine du traitement des eaux avec pour finalité la chloration, l'oxygénation ou l'ozonation. L'application aux fluides complexes est possible, mais encore assez mal documentée. Il en est de même pour les

applications à la dispersion de gaz dans les milieux alimentaires, même si celles-ci sont en cours de développement (Talansier, 2009).

Comme les mélangeurs statiques sont caractérisés par des temps de séjour assez courts et des pertes de charge importantes, ils sont souvent utilisés en aval d'un système de pré-dispersion pour affiner une mousse grossière. La force motrice du foisonnement est ici la perte de charge. Celle-ci inclut non seulement la contribution du tube vide de même diamètre que le mélangeur, mais également la perte de charge additionnelle engendrée par les éléments qui est en général bien plus élevée que celle de la conduite vide. En pratique, il semblerait que seulement une fraction de cette énergie est réellement utile au foisonnement, que l'on soit en régime laminaire ou turbulent. Celle-ci est fortement liée à la géométrie des éléments.

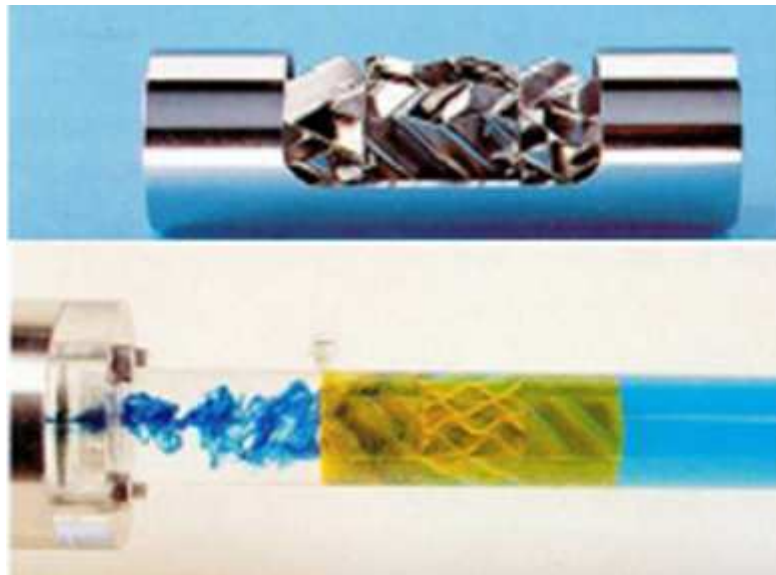


Figure I.26. Exemple d'un mélangeur statique de type Sulzer SMV®

(<http://www.sulzerchemtech.com>).

Les paramètres opératoires sur lesquels on peut jouer dans les systèmes de dispersion statiques sont le débit de liquide et le débit de gaz, alors que les paramètres géométriques, outre la géométrie des éléments qui est définie par le fournisseur, sont le nombre d'éléments en série, le diamètre du tube et l'angle entre deux éléments consécutifs. En pratique, le débit de solution est souvent imposé dans les procédés continus par les étapes antérieures et postérieures au foisonnement, tandis que le rapport entre les débits de gaz et de liquide est imposé par le taux de foisonnement désiré. En conséquence, les variables-clés pour le dimensionnement et l'extrapolation sont le diamètre et le nombre d'éléments en série.

Augmenter le nombre d'éléments améliore la dispersion du gaz, mais au prix d'une augmentation des pertes de charge. L'augmentation du diamètre permet de conserver une perte de charge compatible avec les autres équipements (pompes, compresseurs ...), mais au prix d'une réduction de la force motrice de la dispersion. Du point de vue technologique, les mélangeurs de type SMX (Sulzer) et Kenics (Chemineer) sont ceux qui ont été le plus abondamment étudiés en tant que disperseur, mais presque toujours pour des applications de type transfert de matière. Le système SMX semble en général le plus performant des deux en termes d'augmentation de l'aire interfaciale.

Globalement, on retiendra que l'utilisation des mélangeurs statiques pour le foisonnement présente de multiples avantages. Parmi ceux qui n'ont pas encore été cités, on notera que les techniques d'extrapolation sont mieux connues et mieux maîtrisées que pour les systèmes rotatifs. Toutefois, il ne faut pas négliger les inconvénients inhérents à la géométrie des éléments, et notamment les risques de contamination dus à la difficulté de nettoyer les recoins des obstacles, ainsi que les fortes pressions requises lorsque les milieux sont très visqueux (par exemple à base de sirop de glucose pour les fourrages). En gros, on retiendra qu'ils sont surtout efficaces pour les produits faciles à foisonner puisque les temps de séjour y sont courts et l'énergie dissipée y est en général plus faible que dans les systèmes rotor-stator.

II.4.3.4. Une technologie pionnière : les techniques membranaires

Le foisonnement par membrane représente une méthode innovante de production des mousses alimentaire utilisant des membranes microporeuses. Cette méthode est basée sur le passage forcé de la phase dispersée à travers des pores d'une membrane généralement tubulaire dans la phase continue. Les bulles formées de cette manière sont rapidement couvertes de substances actives contenues dans la phase continue et se détachent ensuite de la surface de la membrane à cause des forces de cisaillement exercées par la phase qui s'écoule tangentiellement à la surface membranaire lorsque la bulle atteint une taille critique. Les facteurs opératoires clés sont donc la pression transmembranaire et le débit de phase continue.

Contrairement aux procédés de foisonnement classiques de type « rotor-stator » où de grosses bulles sont incorporées dans la phase continue et divisées par la suite au moyen des forces mécaniques, les bulles générées par les unités membranaires présentent de très faibles diamètres dès leur formation. Sur la Figure I.27., nous présentons le processus de formation des bulles en sortie des pores des membranes. Ce mécanisme de formation original de la mousse est susceptible de générer de nouvelles microstructures et textures, présentant une

vaste gamme de nouvelles fonctionnalités qui pourraient différer fortement de celles des mousses produites à partir de la technologie traditionnelle « rotor-stator ». Si l'apport d'énergie nécessaire à la formation des bulles est plus faible que pour l'unité rotor-stator, les problèmes à résoudre concernent encore le choix du matériau de la membrane et de son degré d'hydrophobicité, mais aussi celui de la taille des pores et de sa distribution des tailles. Un autre facteur procédé d'importance est la température à laquelle on conduit le foisonnement. Les principaux inconvénients de la technique sont assez proches de ceux des mélangeurs statiques : il s'agit par exemple du coût et de la difficulté de véhiculer des phases de haute viscosité, ainsi que la problématique de la nettoyabilité des membranes.

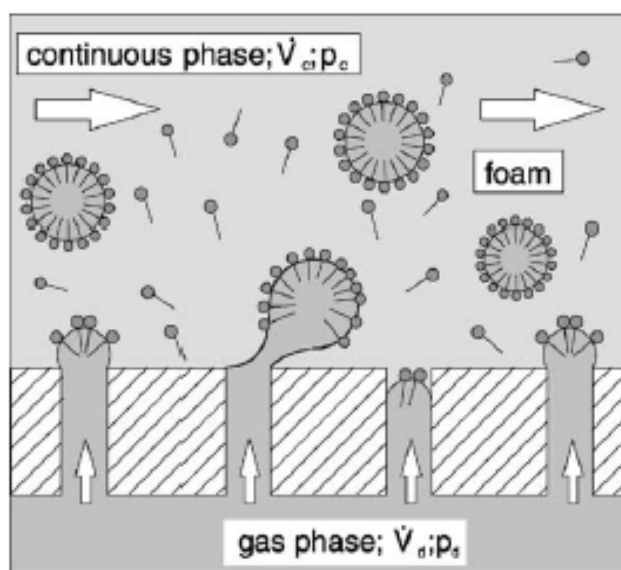


Figure I.27. Formation des bulles et d'une mousse à partir d'une technique membranaire
(Bals & Kulozik, 2003).

Globalement, on retiendra que les procédés membranaires semblent constituer une technique séduisante pour réaliser le foisonnement de produits de faible viscosité formant facilement une mousse. En revanche, leur applicabilité aux produits visqueux ou présentant un caractère solide important reste encore à démontrer ; quant à ceux chargés en matières solides broyées (matières premières à base de légumes, poisson, viande ...), les risques de colmatage la rendent fortement improbable.

II.5. CONCLUSIONS DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette étude bibliographique nous a permis tout d'abord de préciser le contexte de l'étude en décrivant la structure des mousses obtenues à partir de protéines sériques et en citant les problèmes liés à la production de ce type de produit jusqu'à l'échelle industrielle. En

résumé, on peut ainsi agir sur deux leviers : la formulation et le procédé. Concernant l'aspect formulation, un intérêt particulier semble devoir être porté à la dénaturation et à l'agrégation des protéines sériques afin d'améliorer les caractéristiques physico-chimiques des mousses. Le but de cette étude va donc être d'accroître notre compréhension de l'impact des agrégats protéiques sur la formation et la stabilisation des mousses à base de protéines sériques, en travaillant à la fois sur des systèmes de laboratoire et des unités pilotes représentant différents systèmes industriels, et ceci en s'intéressant simultanément :

- ✓ aux conditions de dénaturation et d'agrégation des solutions de WPI ;
- ✓ à la génération d'agrégats protéiques adaptés à la stabilisation des mousses ;
- ✓ à l'influence de la technologie utilisée pour l'aération ;
- ✓ aux conditions opératoires de l'opération de foisonnement.

Toutefois, avant de présenter notre apport à cette thématique, nous consacrerons le chapitre suivant à la description des produits, matériels et méthodes utilisés dans le cadre de ce travail.

Chapitre 2.

Matériel et Méthodes

I. MATERIEL

I.1. PROTEINES SERIQUES

L'isolat de protéines sériques (Whey Protein Isolate, WPI) utilisé dans cette étude est le Promilk 852 FB1 fourni par la société IDI Ingrédients (Arras, France). Cette poudre est constituée de 83,35% w/w protéines; 2,9% minéraux; <1% matière grasse. Cette poudre de protéines a été obtenue par une ultrafiltration suivie d'une atomisation. Une analyse par chromatographie de filtration sur gel a montré que la poudre d'isolat de protéines sériques contient 68% de β -Lg, 26,5% d' α -La, 3,24% d'Ig et 0,69% de BSA.

I.2. HYDRATATION DE LA POUDRE D'ISOLAT PROTEIQUE

Pour les solutions préparées à l'échelle du laboratoire, la poudre de protéines sériques a été mise en solution dans de l'eau déminéralisée à 40°C sous agitation mécanique modérée (1500 tpm) à l'aide d'un agitateur IKA équipé d'une pale défloculeuse pendant 2 heures. Les solutions protéiques à l'échelle pilote ont été préparées dans une cuve Cosimi de 40 cm de diamètre et d'une capacité de 50 L équipée d'une ancre à trois pales tournant à une vitesse maximale de 100 tr/min, l'agitation est conduite à 40°C pour une durée de 2h. Pour chaque préparation nous avons préparé une quantité de 20 L de solution protéique. On doit également préciser que tous nos travaux expérimentaux ont été réalisés dans une gamme de concentration en protéines sériques comprise entre 2 et 4% w/v. Toutefois, la majeure partie de nos expériences ont été réalisées sur des solutions protéiques à 2% w/v.

Les solutions obtenues ont un pH de 6,7, proche de celui du lait ; celui-ci est ensuite ajusté à 7 par ajout d'une solution de NaOH à 1M. La force ionique a ensuite été fixée à 50 ou 100mM par ajout de NaCl. Afin de garantir une hydratation complète des protéines, les solutions ont été laissées au repos pendant douze heures dans une chambre froide à 4°C. Pour éviter tout risque de croissance microbienne, 0,05% d'azoture de sodium est ajouté dans les solutions stockées pour plus d'une semaine.

1.3. DENATURATION ET AGREGATION DES PROTEINES PAR TRAITEMENT THERMIQUE

Le lendemain, les solutions protéiques ont été plongées au bain marie afin de les ramener à une température supérieure à 10°C avant de pouvoir être introduites dans le bac de l'échangeur de chaleur. La température est choisie afin d'appliquer le traitement voulu et le débit de circulation du produit dans l'échangeur réglé au maximum (20 L/h).

Les solutions ainsi traitées ont été destinées directement à l'opération de foisonnement ou bien ont subi différents post-traitements. Dans le cas des solutions de WPI destinées au foisonnement, celles-ci ont été directement refroidies par le circuit de refroidissement et puis elles ont été placées en chambre froide à 4°C. En revanche, les solutions de WPI destinées à différents post-traitements thermiques n'ont pas été refroidies et elles ont subi directement un post-traitement de 15, 30 minutes, 1, 2, 3 ou 4 heures à 80°C dans la cuve COSIMI employée précédemment, et ce sous une faible agitation de 20 tours/minutes.

Echangeur tubulaire de type Actijoule®

Les solutions d'isolat de protéines sériques préparées précédemment ont été ensuite traitées à des températures entre 70 et 100°C dans un échangeur tubulaire de type Actijoule® (ACTINI, France) (Figure II.1.). Ce pilote comprend douze tubes en série qui représentent la section de chauffage (12 mm de diamètre) et un dernier tube qui correspond à la section de chambrage (18 mm diamètre). Le débit dans l'échangeur est de 20 L/h et le régime d'écoulement s'avère être laminaire ($Re \sim 100$). Connaissant les différents volumes de chaque tube et maîtrisant le débit du produit, nous avons calculé le temps de séjour dans l'échangeur de chaleur (à savoir un temps de séjour de 300s, dont 56s de chambrage). Le relevé de températures nous a permis d'effectuer le bilan thermique caractérisant le traitement appliqué. Le débit du produit a été vérifié en mesurant le temps nécessaire pour remplir une éprouvette de 250mL. Tout de suite après le traitement thermique, les solutions ont été refroidies et entreposées à 4°C. Les solutions protéiques natives ainsi que celles traitées thermiquement sont ensuite caractérisées par les méthodes décrites dans la section II.1.

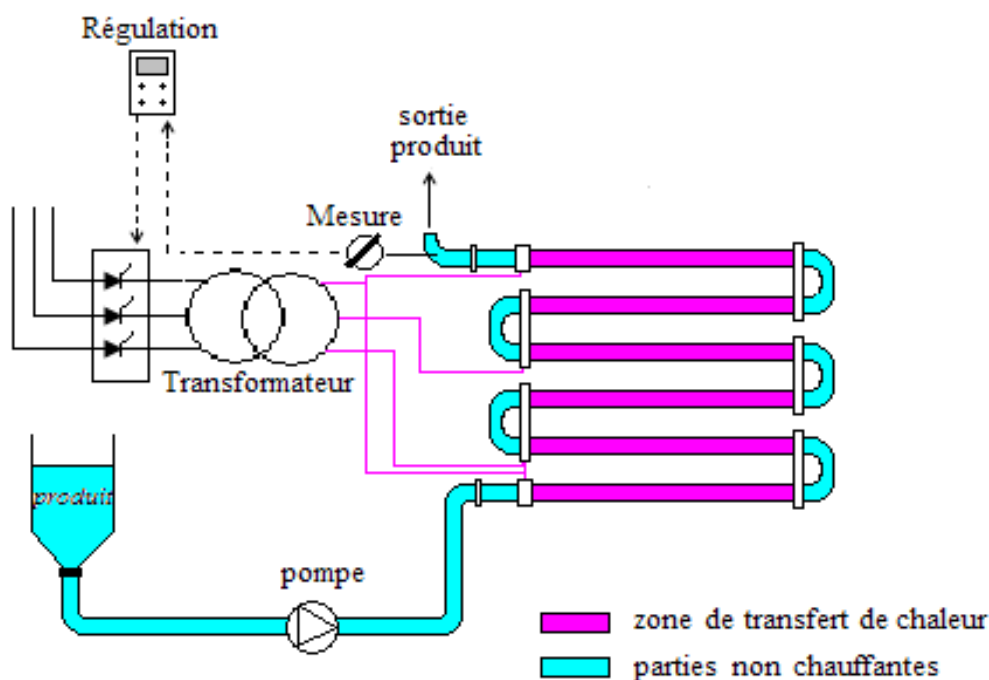


Figure II.1. Schéma de l'échangeur tubulaire.

Echangeur à plaques appelé « Pasteurisateur GPA PAO SP »

Les solutions d'isolat de protéines sériques qui sont destinées à faire l'objet des essais de foisonnement en continu ont été traitées thermiquement dans un échangeur à plaques « Pasteurisateur GPA PAO SP » (CIAT, France) dont le schéma est présenté dans la Figure II.2. Ce pilote comporte un ensemble de 10 plaques (représentant la section de chauffage) et également un tube qui correspond à la section de chambrage (10 mm diamètre). Le débit dans l'échangeur est de 5 L/h, le réglage étant fait au moyen d'une pompe péristaltique. Les paramètres sur l'échangeur à plaques ont été réglés de manière à respecter les conditions précédemment imposées (à savoir un temps de séjour de 300s) lors du traitement thermique des solutions de WPI dans l'échangeur tubulaire « Actijoule® ».

De même, après le traitement thermique, les solutions protéiques ont été refroidies et entreposées à 4°C dans une chambre froide. Les solutions protéiques natives ainsi que celles traitées thermiquement sont ensuite caractérisées par les méthodes décrites dans la section II.1.

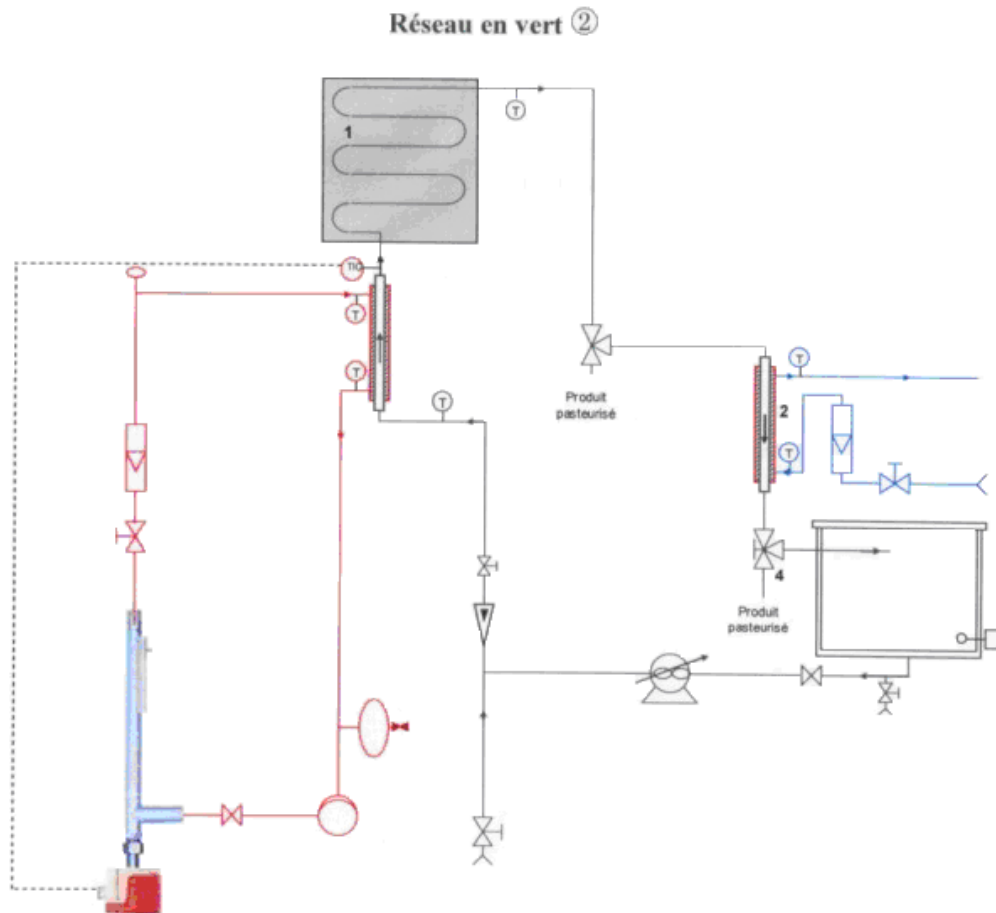


Figure II.2. Schéma de l'échangeur à plaques.

Post-traitement thermique

Les solutions protéiques à 3% w/v ont été préparées comme décrit précédemment dans la section I.2. dans une cuve Cosimi, le pH a été ajusté à 7 et puis laissées au repos pendant douze heures dans une chambre froide à 4°C. Les solutions d'isolat de protéines sériques ont été traitées à 100°C dans un échangeur tubulaire de type Actijoule® (Figure II.1.). Les solutions de protéines sériques ainsi dénaturées ont subi ensuite un post-traitement thermique à 80°C dans la cuve Cosimi, pour une durée de traitement thermique comprise entre 15 minutes et 4 heures.

II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

II.1. CARACTERISATION DES PROTEINES ET DES AGREGATS EN SOLUTION

II.1.1. Calorimétrie thermique différentielle (DSC)

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est une technique thermo-analytique permettant de mesurer l'absorption ou la libération de chaleur d'un système donné. Lors du chauffage, les protéines sériques sont dénaturées, c'est-à-dire que leur conformation spatiale peut être modifiée, le plus souvent irréversiblement. La calorimétrie différentielle permet de déterminer la température de changement d'état ou de dénaturation et la quantité d'énergie qu'il faut fournir aux molécules pour qu'elles changent de conformation spatiale.

II.1.1.1. Principe de l'appareil

Les protéines sont chauffées et le flux de chaleur différentiel entre l'échantillon et une référence inerte est mesuré au cours du temps (cf. Figure II.3.). Les courbes obtenues (ou thermogrammes) permettent de séparer d'une part la chaleur sensible (liée à la capacité calorifique) et d'autre part les chaleurs latentes liées aux changements d'état et les chaleurs de réaction qui apparaissent sous la forme de pics. Si l'échantillon ne subit pas de changement d'état, le flux échangé avec la référence se limite à la chaleur sensible (ligne de base). Un pic, respectivement positif ou négatif par rapport à la ligne de base, survient lorsqu'une réaction respectivement exothermique ou endothermique a lieu. Pour les protéines, le sommet du pic endothermique indique leur température moyenne de dénaturation (T_d). L'analyse enthalpique différentielle permet ainsi de connaître les températures des changements d'état, mais aussi leurs enthalpies associées représentées par les aires sous leurs pics respectifs.

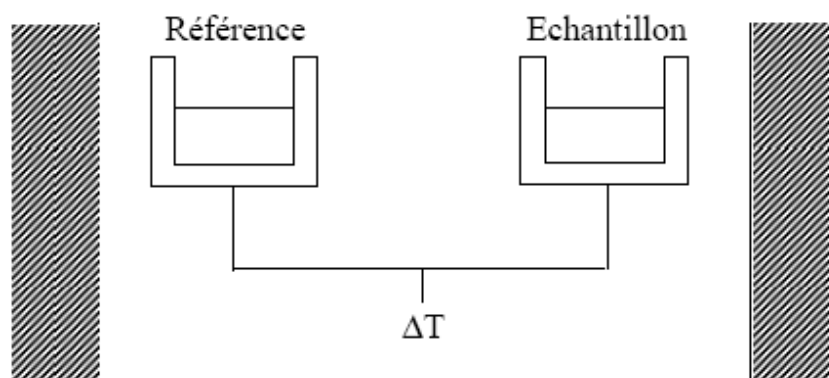


Figure II.3. Principe de la calorimétrie thermique différentielle.

Les thermogrammes des protéines natives ou issues des différents traitements, ont été obtenus avec un calorimètre différentiel SETARAM III (SETARAM, France), en chauffant l'échantillon à 1,2°C/min de 20 à 120°C (après une période d'équilibration de 10 minutes à 20°C), puis en refroidissant l'échantillon de 120 à 20°C. Afin d'obtenir une réponse quasi-instantanée au transfert de chaleur, et ainsi avoir une bonne précision dans les mesures, la masse d'échantillon introduite dans la cellule de mesure est très réduite, de l'ordre de 800 mg. La référence inerte est composée d'eau distillée contenue dans une cellule identique.

Le degré de dénaturation a été calculé à partir de la surface du pic d'une solution préalablement traitée thermiquement en échangeur de chaleur rapportée à la surface du pic mesurée pour la solution native. Chaque mesure est répétée de 2 à 4 fois avec des solutions d'échantillons différentes.

II.1.2. Distribution granulométrique

La granulométrie par diffraction et diffusion de la lumière est une des techniques de mesure de distribution de tailles de particules les plus récentes et les plus pratiques. C'est aussi une des méthodes les plus rapides. Il faut cependant distinguer deux types d'appareils qui ont tous deux été utilisés dans ce travail.

II.1.2.1. Diffraction de la lumière

Lors des mesures par diffraction de la lumière, l'appareil utilisé est un Malvern Mastersizer S. Dans celui-ci, un faisceau laser rouge parallèle (de 18 mm de diamètre et issu d'un tube à gaz hélium-néon) est envoyé sur la cellule de mesure, puis sur la lentille dans un montage de Fourier. L'ensemble des faisceaux (faisceau laser principal et cône de diffraction créé par les particules en suspension dans la cellule de mesure) est capté et focalisé par une lentille de Fourier qui ramène sur le détecteur les faisceaux d'intensité lumineuse différente déviés par les particules.

En pratique, les échantillons à mesurer doivent être dilués avant d'être mis en circulation dans la cellule appropriée. Les particules font dévier le faisceau laser qui les frappe de son axe principal, selon un phénomène connu sous le nom de « light-scattering », improprement traduit en français par « diffusion de la lumière », car le faisceau transmis se diffuse en fait dans toutes les directions de l'espace environnant de la particule. La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de mesurer avec précision la taille des particules. Les particules de plus grande taille dévient des quantités importantes de lumière, mais sur des angles faibles par rapport à l'axe du faisceau laser incident. En revanche, les petites particules dévient des quantités infimes de lumière, mais sur des angles beaucoup plus larges, jusqu'à former des « halos » homogènes autour d'elles (Figure II.4).

Le montage utilise une lentille inverse de Fourier 300 RF, car cette lentille permet de mesurer des diamètres de particules sur une gamme s'étendant de 0,05 à 900 micromètres. Les intensités reçues aux différents angles par les photodiodes en silicium sont numérisées, puis analysées par calcul sur des matrices inverses. Le résultat du calcul est fourni sous la forme d'un histogramme en nombre ou en volume caractérisé le plus souvent par un diamètre médian, un diamètre moyen et un indice de dispersion (span). Les indices de réfraction de nos milieux sont 1,52 pour la phase dispersé (protéines sériques agrégées) et 1,33 pour l'eau. L'indice d'adsorption est fixé à $1/1000^{\text{ème}}$. La solution est diluée au $1/100^{\text{e}}$ dans le porte-échantillon de façon à atteindre un taux d'obscurité entre 10 et 20%.

La dispersion de la distribution granulométrique est donnée sous la forme d'un histogramme ou bien est évaluée par un indice, le *span*, présenté dans l'équation suivante :

$$\text{span} = \frac{[d_{90} - d_{10}]}{d_{50}} \quad \text{Equation II.1.}$$

où d_{90} , d_{50} et d_{10} [m] sont respectivement les diamètres de bulles/particules pour lesquels respectivement 90, 50 et 10% du volume de la phase dispersée est inférieure à ces dimensions.

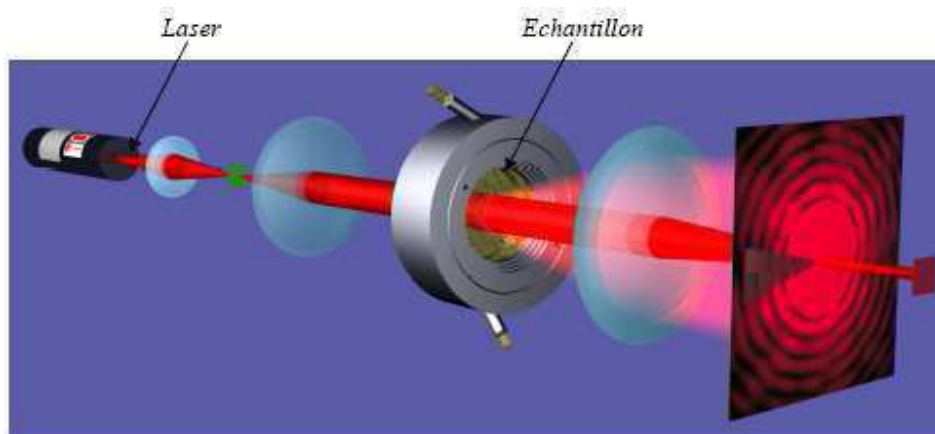


Figure II.4. Principe du granulomètre laser.

II.1.2.2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La granulométrie laser classique ne permet pas d'appréhender avec précision les plus petites populations d'agrégats formés dont la taille est de quelques dizaines de nm. Nous avons donc utilisé la diffusion dynamique de la lumière pour y parvenir. La diffusion dynamique de la lumière (en anglais, « dynamic light-scattering » ou DLS) permet la mesure de particules de taille variant de 3 nm à 6 μm environ. Comme la méthode standard, elle permet l'analyse de la polydispersité d'une solution, d'avoir plus d'information sur la distribution des tailles des molécules présentes dans la solution étudiée et de détecter la présence ou non d'agrégats protéiques. La méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) est basée sur le principe de diffusion de la lumière par des particules (colloïdales) soumises à des mouvements thermiques aléatoires (mouvement brownien), résultant de l'interaction des particules avec le liquide de suspension (Figure II.5.). Dans la théorie de Stokes-Einstein sur le mouvement brownien, le mouvement est déterminé par la viscosité du liquide de suspension. À partir des mesures de vitesse de déplacement et connaissant la température et la viscosité du liquide, on peut accéder à la granulométrie. Dans le cas présent, ce sont les fluctuations dans le temps de la diffusion de la lumière qui peuvent être reliées à la diffusivité des particules dans leur solvant et donc, par la suite, à un diamètre de particule. Pour une distribution étroite de particules au-dessous de 200nm, la DLS est une technique très efficace, rapide et précise. La méthode est moins précise lorsque la

solution à analyser n'a pas une distribution étroite de tailles de particules ou lorsque celle-ci possède plusieurs maxima (ou modes).

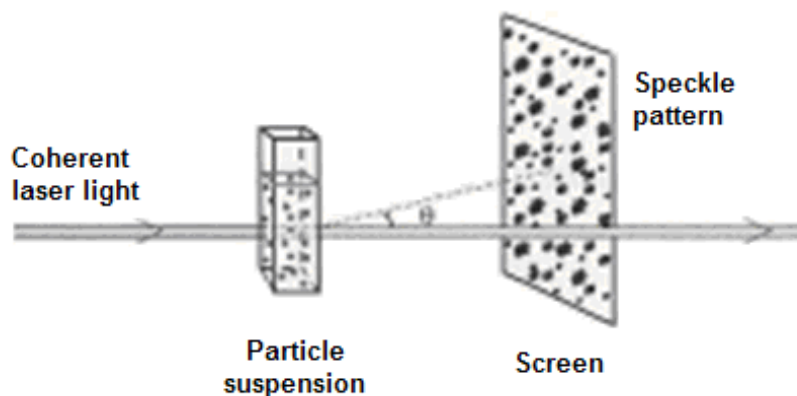


Figure II.5. Schéma de principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Pour ces mesures, un appareil de type Zetasizer NanoZS Instrument (Malvern, UK) a été employé. 2 mL de chaque échantillon de solution d'isolat de protéines sériques ont été transférés dans une cuve plastique représentant la cellule de mesure. Les indices de réfraction de nos milieux sont de 1,45 pour la phase dispersée (les agrégats protéiques) et de 1,33 pour l'eau. La température d'analyse des échantillons à l'intérieur du Zetasizer a toujours été maintenue à 20°C. Chaque mesure a été répétée au moins 3 fois avec des prises d'échantillons différentes.

II.1.3. Chromatographie de filtration sur gel

La distribution des masses moléculaires joue un rôle important sur les propriétés physico-chimiques des polymères. La chromatographie de filtration sur gel dite aussi chromatographie d'exclusion stérique est une méthode largement utilisée qui permet de caractériser cette distribution des masses moléculaires. Cette technique est basée sur la rétention sélective des molécules de soluté en fonction de leur taille en solution. Elle permet d'éluer une solution de protéines de tailles différentes dans une colonne remplie d'un tamis moléculaire par rayon hydrodynamique décroissant.

II.1.3.1. Principe de l'appareil

Suivant le poids moléculaire et la configuration spatiale des macromolécules, les « pelotes » formées par ces molécules ont un volume hydrodynamique plus ou moins important. La solution de macromolécules est amenée à traverser une ou plusieurs colonnes chromatographiques remplies d'un tamis moléculaire. Le diamètre des pores est choisi dans des fourchettes qui permettent de séparer les macromolécules selon leur taille.

En effet, le volume poreux accessible à des macromolécules d'un volume hydrodynamique donné dépend de la taille des pores : plus les macromolécules sont grosses, plus faible est le volume poreux auquel elles ont accès, c'est-à-dire que leur temps de rétention dans le gel est d'autant plus court. On constate effectivement que les macromolécules de masse élevée sortent les premières de la colonne et ainsi de suite, jusqu'aux plus légères qui ont le temps de rétention le plus grand.

II.1.3.2. Mode opératoire

L'appareil utilisé (Waters HPLC system, Milford, MA, USA) comprend une colonne TSK 6000 d'une longueur de 30 cm (Tosohaas, Montgomeryville, PA, USA). L'éluant est une solution à 0,05 M Tris et 0,1 M NaCl ; il circule avec un débit de 0,4 ml/min durant 40 min. L'injection se fait automatiquement (20 μ L d'une solution de protéines à 5 g/L) et une détection en sortie de colonne par barrette de diodes permet d'enregistrer la densité optique au cours du temps (UV à 280 nm). La quantité de protéines agrégées a été calculée comme le pourcentage de la surface du pic correspondant aux agrégats par rapport à la surface totale du pic de l'échantillon natif en utilisant le logiciel PeakFit (Jandel Scientific software, USA).

II.1.4. Electrophorèse des protéines (SDS-PAGE)

L'électrophorèse est une technique permettant la séparation sous l'influence d'un champ électrique d'un mélange de protéines et la mise en évidence des différents constituants ou fractions. La séparation résulte en fait de la différence de mobilité des protéines qui est essentiellement fonction de leur poids moléculaire.

Chapitre 2. Matériel et techniques expérimentales

Le SDS, tensioactif anionique, a deux fonctions : d'une part dissocier les protéines agrégées ou peu solubles, et d'autre part, conférer aux protéines une charge globale négative afin de permettre leur séparation essentiellement en fonction de leur poids moléculaire. Son action n'est cependant efficace qu'en présence d'un agent réducteur capable de dissocier les liaisons disulfure S-S, i.e. le mercaptoéthanol. L'addition de glycérol et de bleu de bromophénol permet, respectivement, d'augmenter la densité des échantillons pour un meilleur dépôt et de visualiser le front de migration.

Nous avons caractérisé les protéines sériques non traitées (natives) et issues du traitement thermique par deux types d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 5% dans le gel de concentration et à 15% dans le gel de séparation en présence de SDS (INRA, Nantes):

- en condition non dénaturante, en l'absence de β -mercaptoéthanol ;
- en condition dénaturante, en présence de β -mercaptoéthanol.

Les échantillons (solutions de WPI natives ou traitées thermiquement) ont été tout d'abord dilués (x 10) dans de l'eau millipore. Par la suite, 100 μ l de solutions tampons de solubilisation (contenant ou pas du β -ME) ont été ajoutées sur une quantité égale (100 μ l) de solution de WPI diluées précédemment. Les échantillons protéiques ainsi préparés ont été bien agités et puis chauffés à 100°C pour une durée de 15 min. 10 μ l de solution protéique ont été déposés par puits. Afin de situer avec exactitude les bandes correspondant aux différentes protéines (sous ses différentes conformations), les gels sont étalonnés par migration de mélanges de protéines de poids moléculaires connus (Bio-Rad, USA). Les protéines migraient pendant 60 min. dans un tampon électrophorétique Tris-Glycine contenant 0,1% SDS. La tension était de 114 mV pendant les premières minutes de migration puis de 200 mV. Les gels ont été colorés avec 0,05% de bleu de Coomassie G250 dilué dans un mélange eau/éthanol/sulfate d'ammonium/acide phosphorique et puis les gels ont été laissés sur la nuit. Ensuite les gels ont été rincés dans de l'eau millipore (20 min.) et puis gardés pour une durée de 20 min. dans un mélange eau/ethanol (80/20). Les gels d'électrophorèse ont été scannés (Image Scanner III-Seiko Epson, Japon) et la qualité de protéines dans les différentes bandes a été évaluée à l'aide du logiciel LabScan (Suède).

II.1.5. Caractérisation des fractions insolubles par microscopie optique

La microscopie optique est une technique bien adaptée à la visualisation d'échantillons protéiques présentant des particules de taille supérieure au micron afin d'étudier la structure des polymères formés suite à un traitement thermique. Ainsi, le microscope optique (LEICA, Leica Microsystem Wetzlar GmbH, Allemagne) a été employé et a permis la détermination de la morphologie des agrégats protéiques en solution, ainsi qu'une estimation approximative de leur taille (objectif $\times 10$).



Figure II.6. Schéma du microscope optique de type LEICA.

En pratique, la préparation microscopique est réalisée en déposant une petite quantité de solution d'isolat de protéines sériques sur une lame de verre recouverte d'une lamelle. Des images de la préparation ont été ainsi prises à l'aide d'une caméra CCD ; elles ont été transférées par la suite vers un ordinateur pour les traiter. Le logiciel utilisé pour la capture et le traitement des images est Visilog 6.2 (Noesis, France).

II.1.6. Caractérisation des fractions insolubles par analyse d'images

L'analyse d'images est une technologie sensible à la fois aux variations, même très faibles, de la forme des particules, ainsi qu'à la présence éventuelle de fines. Pour analyser la taille et la forme des agrégats protéiques inférieurs à 200 μm localisés dans la fraction insoluble (donc de taille comprise entre 1 et 200 μm), un outil de haute sensibilité, le Sysmex FPIA-3000 Flow Particle Image Analyzer (Malvern), a été employé. Celui-ci donne accès à une grande quantité de paramètres quantifiés sur chaque individu présent dans l'échantillon analysé, parmi lesquels la taille et les paramètres morphologiques, auxquels est associée l'image de l'objet considéré dans le but de fournir une confirmation visuelle supplémentaire des grandeurs estimées.

II.1.6.1. Principe de l'appareil

Un échantillon de suspension diluée contenant les particules à analyser est aspiré à l'aide d'une pipette. Cette suspension traverse ensuite une cellule où les images des particules sont capturées à l'aide d'une camera CCD. Le système est également équipé d'un processeur ultra-rapide. Grâce à une série d'étapes de traitements des images numériques, chaque particule est détectée et labellisée, son contour est extrait de l'image et les paramètres morphologiques de ce dernier sont quantifiés (Figure II.7.).

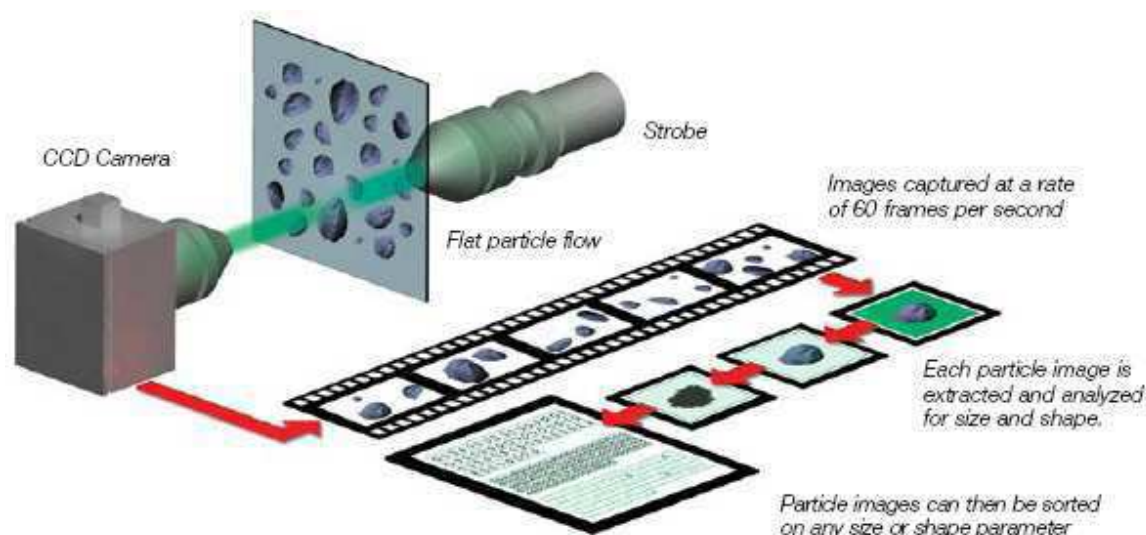


Figure II.7. Schéma de principe du SYSMEX FPIA-3000.

II.1.7. Caractérisation des fractions solubles par microscopie à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique (AFM) est un microscope à sonde locale développé par Binnig, Quate et Gerger en 1986. L'imagerie AFM n'est pas fondée sur les lois de l'optique visible ou électronique, et en ce sens, il ne s'agit pas d'une technique de microscopie classique. Le contraste est d'origine mécanique : une pointe de dimension nanométrique couplée à un microlevier faisant office de ressort vient sonder mécaniquement la surface de l'échantillon et le contraste traduit l'interaction entre la sonde et la surface. La technique présente deux performances particulièrement originales : d'une part, l'AFM est capable de fournir une représentation topographique des molécules (résolution verticale de quelques Å) ; d'autre part, l'observation peut être conduite soit à l'air après séchage (ou sous vide pour augmenter la résolution), soit en milieu liquide sans figer ni sécher les molécules adsorbées sur la surface.

II.1.7.1. Principe et différents modes

Les organes essentiels de l'AFM sont schématisés sur la Figure II.8. Une pointe de dimensions nanométriques (~10-20 nm) située à l'extrémité d'un microlevier (cantilever) est approchée d'une surface et est soit déplacée verticalement, pour construire une courbe force-distance, soit balayée latéralement par rapport à la surface de l'échantillon, pour construire une image. Les déplacements sont commandés par les déformations d'une céramique piézoélectrique sous l'effet de la tension qui lui est appliquée. Les déformations du microlevier en fonction de l'interaction pointe-surface sont suivies par un faisceau laser réfléchi sur le microlevier vers une photodiode à quatre cadrans, qui convertit les déplacements du spot lumineux en signaux électriques. Ceux-ci sont traités par une électronique et une informatique de contrôle, et la répétition de ce processus pour différentes positions verticales ou dans une zone de balayage aboutit respectivement à la construction d'une courbe force-distance ou à la construction d'une image tridimensionnelle de la surface de l'échantillon.

L'interaction pointe-surface de l'échantillon se traduit par une force F_I qui dépend de la distance pointe du microlevier-surface de l'échantillon Δz . La force d'interaction est reliée à la déflexion du microlevier par la loi de Hooke :

$$F_I = k_I \Delta z \quad \text{Equation II.2.}$$

dans laquelle k_I est la constante de raideur de la pointe et Δz la déflexion du microlevier.

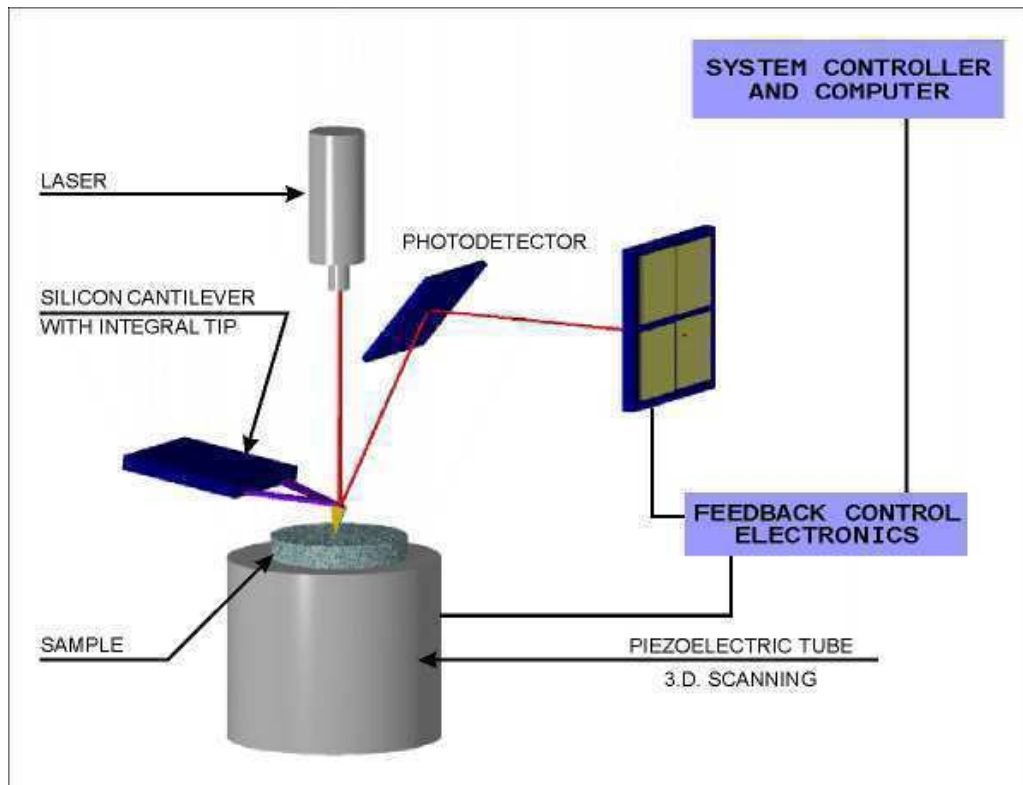


Figure II.8. Schéma de principe de l'AFM.

Le microlevier peut se courber sous l'action de forces attractives ou répulsives (électrostatique, magnétique, Van der Waals) dépendant de la nature de l'échantillon et de la distance entre le levier et la surface de l'échantillon. La distance pointe-échantillon influe donc fortement sur le potentiel dérivant de la force d'interaction. On distingue donc trois principaux modes (Figure II.9.) :

- *Mode contact* : lorsque la distance pointe-échantillon est faible, les forces répulsives à courte portée neutralisent les forces attractives à longue portée, puis les dominent.
- *Mode non-contact* : on fait osciller le microlevier à sa fréquence de résonance avec une faible amplitude d'oscillation et relativement loin de la surface. La pointe n'est donc pas en contact avec la surface : la force d'interaction pointe-surface reste hors du régime répulsif à courte distance et les forces attractives à longue portée dominent.
- *Mode contact intermittent (tapping)*, intermédiaire entre les deux modes précédents : le microlevier oscille à une fréquence fixée, légèrement inférieure à sa fréquence de résonance

libre et la pointe n'atteint le régime répulsif qu'en bout d'oscillation, lorsqu'elle vient effleurer la surface. Le mouvement vibratoire de la pointe minimise le temps de contact et donc la dégradation de l'échantillon.

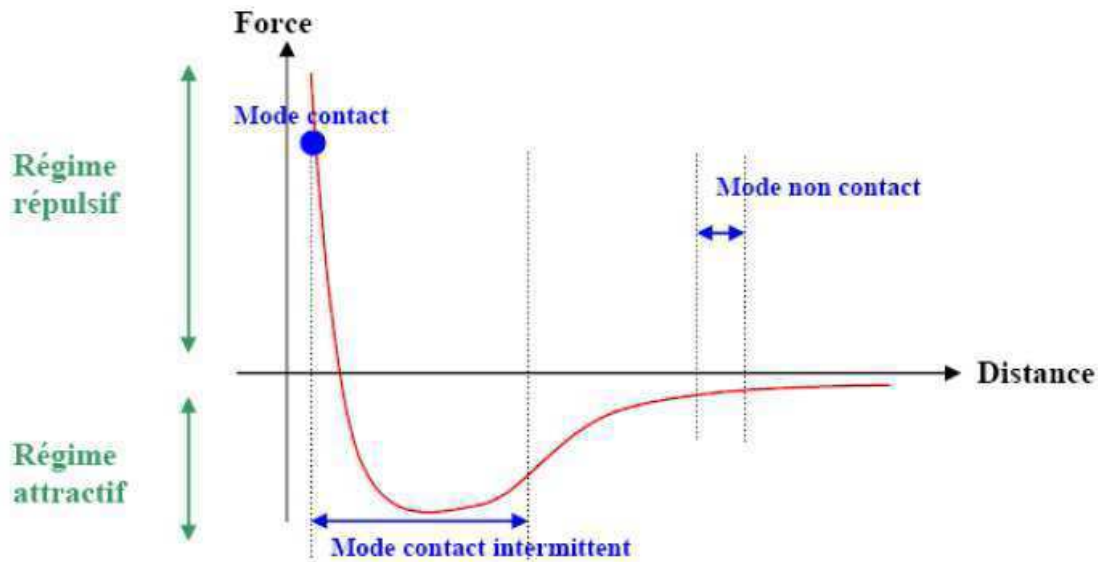


Figure II.9. Régimes de force pour les différents modes d'imagerie AFM.

II.1.7.2. Prélèvements et observations

Les images ont été obtenues sur un AFM PSI CP en mode tapping avec une force faible. La solution a été diluée 1000 fois dans une solution saline à 50mM puis 100 fois dans de l'eau millipore pour diminuer l'agrégation des objets au cours du séchage et la formation de cristaux de sels. Au final, la solution a une concentration de 30 ng/mL.

Deux types de supports ont été utilisés, un mica très hydrophile et le HOPG (highly oriented polycristalin graphite) très hydrophobe. Une goutte de 3 μ L de la solution de protéines chauffée est déposée sur le support et séchée sous courant d'argon et par la suite, des images sont prises. Comme les protéines sont hydrophiles, elles ont plus d'affinité pour le mica ce qui entraîne un étalement plus important et la formation d'un film à la surface.

II.1.8. Rhéologie des solutions d'isolat de protéines sériques en mode écoulement

Toutes les mesures sont effectuées à 20°C à l'aide d'un rhéomètre à contrainte imposée (AR 1000, TA Instruments, Waters Corporation, E.U.), piloté par un ordinateur équipé d'un logiciel de traitement de données. L'appareil est également équipé d'un système de régulation en température de type Peltier.

Nous avons choisi de réaliser les mesures avec une géométrie de type Couette, adaptée à la mesure de faibles viscosités (Figure II.10.). Dans cette géométrie, la substance étudiée est cisailée entre deux cylindres de révolution, coaxiaux, de rayons respectifs $R_1 = 13,83$ mm et $R_2 = 15$ mm, et de hauteur $h=4,5$ cm. La vitesse de cisaillement a été fixée dans une fourchette comprise entre 50 et 1000 s^{-1} . La mesure a été réalisée en mode logarithmique pendant 2 min avec 10 points par décade.



L'écoulement laminaire cisailant est obtenu en communiquant au cylindre intérieur un mouvement de rotation uniforme de vitesse angulaire ω_0 , l'autre cylindre demeurant immobile. En pratique, on impose au cylindre intérieur un couple de rotation connu M et on mesure sa vitesse angulaire ω_0 . L'écoulement du fluide se décompose alors sous la forme de couches cylindriques coaxiales, animées de vitesses angulaires différentes, variant continûment de 0 (couche en contact avec le cylindre extérieur fixe) à ω_0 (couche en contact avec le cylindre intérieur mobile), comme le montre la Figure II.10. Si l'entrefer entre les deux cylindres est faible (hypothèse d'entrefer étroit), le mouvement relatif des couches les unes par rapport aux autres se traduit par un profil de vitesse quasiment linéaire, ce qui signifie que la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ et que la contrainte visqueuse τ appliquée sont toutes deux à peu près constantes.

Chapitre 2. Matériel et techniques expérimentales

Avec ce système de géométrie à cylindres coaxiaux, la distance entre les cylindres étant petite devant le rayon, on peut admettre que la contrainte de cisaillement τ demeure constante dans l'entrefer. La valeur constante de la contrainte (Pa) est alors égale à :

$$\tau = \frac{M}{4\pi\omega_0} \frac{R_1^2 + R_2^2}{R_1^2 \cdot R_2^2} \quad \text{Equation II.3.}$$

La vitesse de cisaillement (s^{-1}) a alors pour expression :

$$\dot{\gamma} = \frac{R_1\omega_0}{R_2 - R_1} \quad \text{Equation II.4.}$$

Les rhéogrammes enregistrés lors de la mesure n'ont de signification que dans la mesure où la condition « entrefer très étroit entre les deux cylindres » est respectée et que l'on se trouve en régime laminaire (absence de tourbillons de Taylor).

II.1.9. Tension de surface

La tension de surface (σ) des échantillons étudiés a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre K12 (Krüss GmbH, Allemagne) par la méthode de la lame de Wilhelmy (Figure II.11.). La méthode consiste à immerger une plaque rectangulaire en platine de géométrie connue, appelée plaque de Wilhelmy, fixée verticalement et reliée à une balance de précision. La balance est préalablement tarée et la plaque ainsi que le cristalliseur doivent être parfaitement propres (notamment passés à la flamme pour éliminer les impuretés organiques). La lame sèche descend vers le liquide à vitesse de descente fixée et y pénètre jusqu'à 1 mm de profondeur. Au moment du contact lame-liquide, le liquide est attiré vers la plaque à cause des effets de tension superficielle, comme cela est illustré sur la Figure II.11. Une fois la hauteur minimale atteinte, la lame remonte lentement et elle est stabilisée juste au niveau de l'interface (niveau détecté lors de la descente comme le point où la force de poussée exercée par le liquide sur la plaque est maximale). La tension de surface est alors calculée à partir de la force F_l mesurée dans cette position grâce à l'équation suivante :

$$\sigma = \frac{F_l}{L_l \cdot \cos \theta} \quad \text{Equation II.5.}$$

dans laquelle σ est la tension interfaciale; L_l le périmètre mouillé et θ l'angle de contact entre le liquide et la plaque ($\theta=0$ pour le platine qui est supposé mouiller parfaitement la lame).

Chapitre 2. Matériel et techniques expérimentales

La mesure est automatisée grâce au logiciel « Laboratory Desktop » qui permet de déterminer le point de force maximale, puis de mesurer la tension de surface au cours du temps. Les mesures ont été effectuées sur une durée de 10800 s soit 3h tous les 10s. La température des solutions a été maintenue à 10°C au moyen d'un cryothermostat (Huber Polystat CC1, Allemagne) alimentant une double enveloppe qui entoure le cristalliseur.

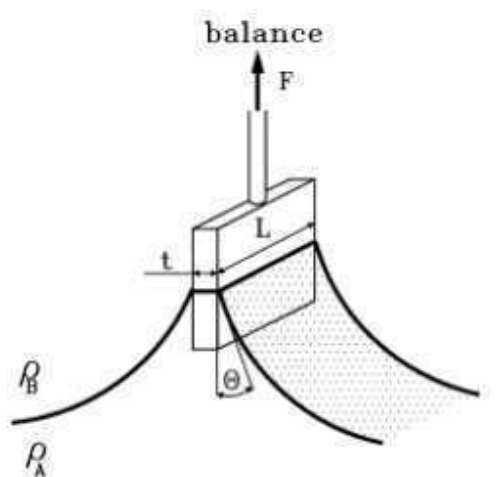


Figure II.11. Principe de la lame de Wilhelmy.

II.2. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX DE FOISSONNEMENT

II.2.1. Procédés discontinus de foisonnement

II.2.1.1. Obtention de la mousse par battage

La méthode la plus commune pour fabriquer une mousse est le battage (ou le fouettage). Cette méthode se rencontre le plus fréquemment dans les travaux d'analyse des propriétés de foisonnement des solutions de protéines. Elle possède aussi l'avantage de se rapprocher en partie des opérations réalisées à l'échelle industrielle (*Kinsella, 1984*).

Un batteur ménager de type KitchenAid Ultra Power Mixer (Kitchen Aid, USA) (Figure II.12.) avec son bol de 4,3 L et un fouet rotatif a été utilisé pour la formation de la mousse. Avant le battage, le bol a été mis au frigo pendant 10 minutes à 4°C pour éviter un gradient de température entre la phase liquide et le batteur. Les solutions de protéines sériques (200mL) ont été foisonnées à niveau 10 (265 tpm) pendant 10 minutes. Pour chaque solution traitée, un minimum de cinq mesures a été effectué.



Fig. II.12. Batteur ménager de type KitchenAid.

II.2.1.2. Evaluation de l'aptitude au foisonnement et de la stabilité des mousses par bullage

Parmi les méthodes expérimentales qui permettent la mesure de l'aptitude au foisonnement des solutions protéiques et de leur stabilité au cours du temps, nous avons choisi une méthode de bullage utilisant un appareil appelé *FoamScan* (IT Concept, France). Celui-ci comporte une colonne en verre non thermostatée (250 mm de hauteur pour un diamètre de 19 mm) équipée de quatre électrodes permettant la mesure de la conductivité de la mousse (Figure II.13.). La mousse formée est éclairée par une source lumineuse uniforme, de type sphère d'intégration, l'image vue de profil est projetée par un objectif télécentrique sur une caméra CCD puis numérisée et visualisée par un logiciel pour suivre l'évolution de la mousse au cours du temps.

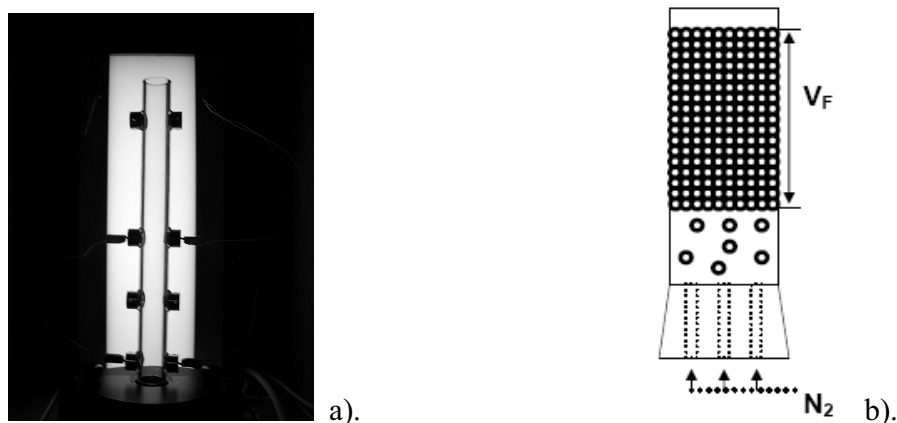


Figure II.13. Schéma de la colonne du FoamScan équipée de 4 électrodes.

Après la calibration des électrodes, pour chaque échantillon, deux étapes sont réalisées. Dans un premier temps, nous procédons au bullage de 12 mL de solution protéique par injection d'azote en bas de la colonne à travers un fritté (N°6). Le débit du gaz est fixé à 35 mL/min. Lorsque le volume de la mousse atteint 35 mL, l'injection de gaz est arrêtée. Commence alors la deuxième étape au cours de laquelle la stabilité de la mousse est évaluée en mesurant la variation de volume et le drainage en fonction du temps. Les paramètres caractéristiques de la mousse sont enregistrés à l'aide du logiciel « Foamsan ». Une paire d'électrodes localisée en bas de la colonne est utilisée pour mesurer la quantité de liquide qui n'est pas intégrée dans la mousse, alors que le volume de liquide dans la mousse est mesuré par conductivité en utilisant trois paires

d'électrodes localisées au long de la colonne. Pour chaque solution traitée, trois répétitions ont été effectuées.

II.2.2. Procédés de foisonnement en continu

II.2.2.1. L'unité de type rotor-stator

On appelle classiquement « rotor-stator » un système mécanique rotatif non raclant à faible entrefer, c'est-à-dire pour lequel la distance entre la partie statique (le « stator ») et la partie mobile (le « rotor ») est faible devant la dimension de l'ensemble. En règle générale, ce sont des « têtes de mélange » cylindriques équipées de dents orthogonales à l'axe d'agitation avec des entrefers supérieures à 1 mm qui sont les plus utilisées pour réaliser le foisonnement des émulsions alimentaires. Ce sont des systèmes de géométrie complexe : en général, le rotor et le stator sont tous deux dotés de rangées de dents orthogonales à l'axe de la symétrie cylindrique de l'unité et disposées en alternance sur le rotor et le stator (Figure II.14.).

L'unité utilisée dans ce travail a été dimensionnée au LGCB et usinée par la société Duprat S.A. Le diamètre du stator est de 35 mm, alors que le diamètre du rotor est de 15 mm et que le diamètre de rotor+dents est de 30 mm. Le rotor et le stator sont munis de sept rangées de six dents à bouts carrées (7,5×4×4 mm). L'entrefer entre le rotor et le stator est 2,5 mm. La géométrie ainsi que les dimensions caractéristiques de ce système sont reportées sur la Figure II.14. Le rotor est relié au moteur IK LaborTechnik RE-16 (Ikawerke, Allemagne) dont la vitesse de rotation peut être contrôlée entre 10-1600 tpm et à la jauge de contrainte IK MR-D1 (Ikavisc, Allemagne). Le foisonneur est muni d'une double enveloppe dans laquelle circule un réfrigérant fourni par un cryostat Haake K20 qui permet de maintenir une température de sortie constante. La solution à foisonner est introduite dans la colonne à l'aide d'une pompe péristaltique (Masterflex, USA) (Figure II.15.). Le gaz (air) est introduit à la base de la colonne à travers un fritté métallique ayant des pores de taille 20 µm. Son débit est imposé à l'aide d'un débitmètre massique Brooks Instruments (USA) entre 5 et 100 mL/min (Figure II.16.). Une vanne a été placée à la sortie de la colonne ; par la simple manipulation de celle-ci, la pression relative à l'intérieur de l'unité de foisonnement peut être ainsi ajustée entre 0-2 bars.

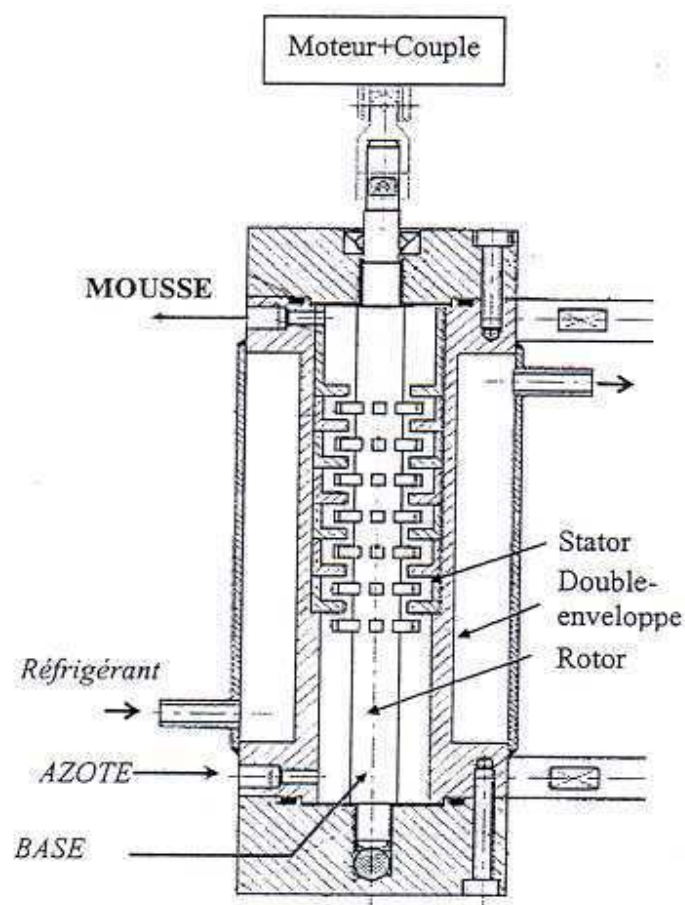


Figure II.14. Schéma en coupe de l'unité rotor-stator.



Figure II.15. Pompe péristaltique.



Figure II.16. Débitmètre massique de gaz.

II.2.2.2. Installation de type colonne à faible entrefer

Une installation pilote de laboratoire constituée d'une colonne simulant un échangeur à surface raclée (*Djelveh et coll. 1995*) a été utilisée pour réaliser le foisonnement en continu (Figure II.17.). Le corps de la colonne est en acier inoxydable et il est constitué de trois étages de 141 mm de hauteur et de 35 mm de diamètre intérieur. Chaque étage est muni d'une double enveloppe dans laquelle circule de l'eau glycolée thermostatée. La circulation de l'eau est assurée par un thermostat Haake K20 (Thermo Electron, France) qui permet de maintenir une température constante à $\pm 1^{\circ}\text{C}$. La dispersion du gaz dans la solution est réalisée par une agitation mécanique à l'aide d'un axe muni de trois éléments à 4 pales droites de 33 mm de diamètre et de 65 mm de hauteur (Figure II.17.). L'axe des agitateurs est relié à un moteur IK LaborTechnik (Ikavisk, Allemagne) dont la vitesse de rotation peut être contrôlée entre 10 et 1600 tpm et qui est équipé d'une jauge de contrainte IK MR-D1 (Ikavisk, Allemagne) permettant la mesure du couple résistant sur l'axe.

Les dispositifs d'alimentation en gaz et en solution d'isolat de protéines, ainsi que les systèmes de maintien et de mesure de la pression de fonctionnement (0-2 bars) dans ce foisonneur sont les mêmes que ceux utilisés précédemment pour l'unité rotor-stator.

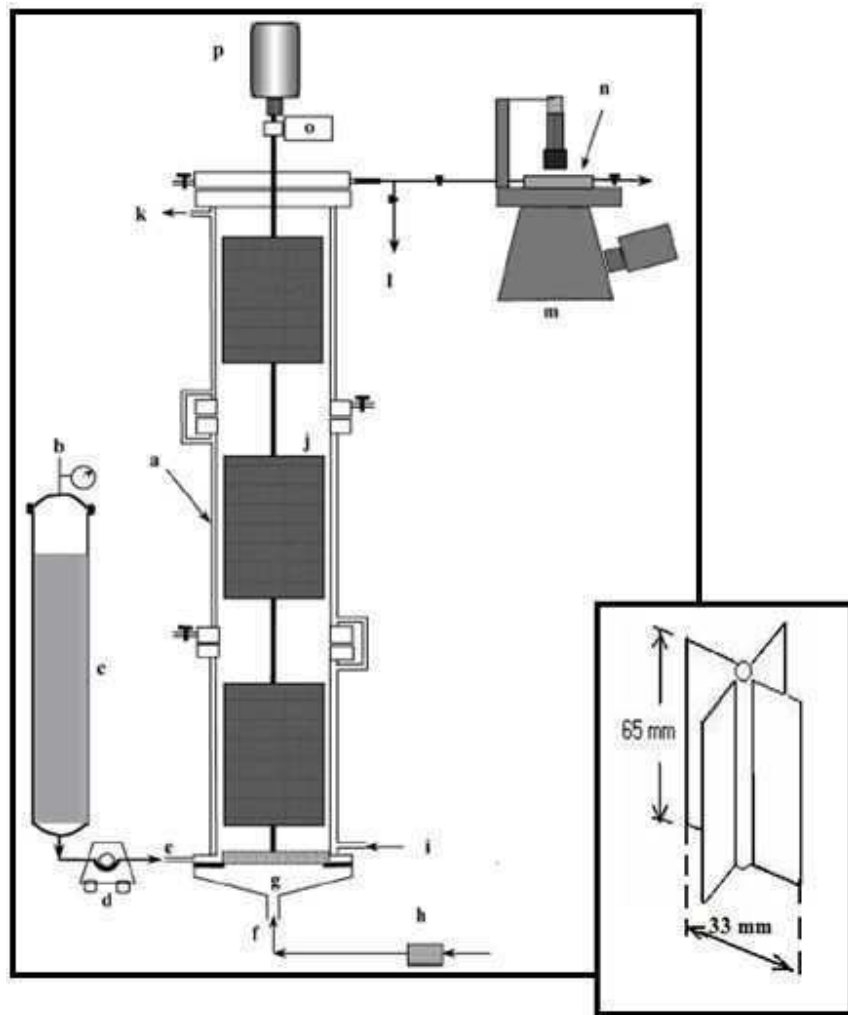


Figure II.17. Schéma de la colonne (a) double enveloppe, (b) air comprimé à 0,5 bar, (c) réservoir d'alimentation phase continue, (d) pompe péristaltique, (e) entrée phase continue, (f) entrée du gaz, (g) fritté, (h) débitmètre massique, (i) entrée réfrigérant, (j) agitateur, (k) sortie de réfrigérant, (l) sortie de mousse, (m) microscope et caméra, (n) cellule en verre, (o) couplemètre, (p) moteur.

II.2.2.3. Paramètres opératoires du foisonnement

Les paramètres opératoires du foisonnement sont les débits volumiques des deux phases liquides et gaz (L et G), la vitesse d'agitation (N) et la contre-pression (P). Deux débits de liquide ont été utilisés (30 mL/min. et 90 mL/min.), alors que le débit de gaz a varié entre 60 mL/min. et 180 mL/min. Pour étudier l'influence de la vitesse d'agitation sur le taux de foisonnement et sur la

taille des bulles, quatre vitesses ont été mises en œuvre: 400, 800, 1200 et 1600 tpm. En revanche, la température n'est pas considérée comme une variable opératoire dans cette étude car le foisonnement a toujours été conduit à une température de 4°C.

D'après la littérature, il est nécessaire d'introduire une fraction volumique de gaz d'au minimum 20-30% pour former une structure de mousse relativement stable en présence de protéines. En dessous de 10%, les interactions bulles-bulles sont insuffisantes pour former un réseau indispensable à la stabilisation des bulles. En revanche, si le débit de gaz est trop élevé, on peut favoriser le phénomène de pistonnage avec formation de bouchons de gaz par coalescence entre le gaz qui n'a pu être dispersé et les bulles insuffisamment stabilisées.

Pour le débit de liquide, nous avons préféré introduire la notion de « temps de séjour apparent ». Dans le cas d'un écoulement monophasique, par exemple, le temps de passage est défini par :

$$\tau_a = \frac{V_u}{L} \quad \text{Equation II.6.}$$

où V_u est le volume utile du foisonneur accessible au fluide.

Dans le cas du foisonnement avec une incorporation totale du gaz dans la mousse, le « temps de séjour apparent » peut être défini par analogie avec la relation précédente pour les deux systèmes (rotor-stator et colonne à faible entrefer) en considérant la mousse comme un pseudo-fluide et en découplant l'influence des débits et celle de la pression. On obtient la relation suivante :

$$\tau_a = \frac{V}{L + G} \quad \text{Equation II.7.}$$

où V_u correspond au rapport du volume utile du foisonneur qui est divisé par la somme des débits volumiques des deux phases (liquide et gaz) sous pression atmosphérique. Ainsi, l'influence des débits a été étudiée par l'intermédiaire de τ_a que l'on a fait varier entre 45 et 100 secondes sur le rotor-stator et entre 100 et 260 secondes sur la colonne à faible entrefer.

On remarquera que si l'incorporation de gaz n'est pas totale et qu'il y a donc un excès de gaz, les temps de séjour des deux phases diffèrent et τ_a reste un paramètre opératoire, mais il perd son sens physique de temps de séjour moyen de la mousse et son utilité comme paramètre d'extrapolation.

II.3. CARACTERISATION DES MOUSSES D'ISOLAT PROTEIQUE

II.3.1. Taux de foisonnement

Le taux de foisonnement (TF) d'une mousse qui représente le volume de gaz incorporé par volume de liquide initial peut être calculé par la relation suivante:

$$TF(\%) = \frac{\rho_s - \rho_M}{\rho_M} \times 100 \quad \text{Equation II.8.}$$

Dans cette relation, ρ_s et ρ_M correspondent respectivement à la masse volumique de la solution de protéines sériques et de la mousse. Elles ont été obtenues par pesée dans un récipient de volume connu (127mL). Immédiatement après foisonnement, la mousse est introduite dans notre cristallisateur (127 mL) à l'aide d'une spatule, et ce le plus délicatement possible afin d'éviter une éventuelle destruction de la mousse. On veille aussi à limiter la formation de poches d'air pouvant fausser la mesure. La mousse en excès est alors retirée du cristallisateur à l'aide d'une lame de microscope afin de niveler la surface.

Nous avons également utilisé une autre grandeur pour quantifier le volume de gaz incorporé : la fraction volumique de gaz, encore appelée taux de gaz ϵ_G . La fraction volumique de gaz incorporé lors du foisonnement ϵ_G se calcule par la formule suivante :

$$\epsilon_G = \frac{\rho_s - \rho_M}{\rho_s} \quad \text{Equation II.9.}$$

Dans le cas du foisonnement en continu, le taux de gaz maximum ϵ_{\max} qu'il est possible d'atteindre sous pression atmosphérique s'exprime à partir des débits volumiques de gaz et de solution de la façon suivante :

$$\epsilon_{\max} = \frac{G}{L + G} \quad \text{Equation II.10.}$$

II.3.2. Stabilité contre le drainage

Le drainage de la phase liquide dû à la gravité représente le principal mécanisme de déstabilisation des mousses (Zhu & Damodaran, 1994). Lors de nos expérimentations, deux types

de caractérisations ont été employés : la stabilité à court terme et également la stabilité à long terme.

Stabilité à court terme

Les mesures de drainage ont été réalisées immédiatement après la mesure de la masse volumique de la mousse. La cinétique de drainage a été déterminée par la mesure de la quantité de liquide drainée dans un cylindre de 25 mL pour un cycle de drainage de 3 heures. Le même cristalliseur (approximativement 127 mL) qui a servi précédemment à la mesure du taux de foisonnement, a été ensuite fixé à l'envers, au-dessus d'un cylindre afin de collecter le liquide drainé. La quantité de liquide drainé récupérée dans un cylindre, a été quantifiée à l'aide d'un montage expérimental composé d'une balance de précision (Sartorius AG, Allemagne) et d'un ordinateur portable équipé d'un logiciel capable d'enregistrer toutes les 10 secondes la masse de liquide drainée (Figure II.18.). Les courbes qui décrivent la cinétique de drainage des différents échantillons de mousses ont été obtenues en utilisant la méthode de *Howell & Taylor (1995)* : la fraction massique de liquide drainé (F) a été exprimée à partir de la masse de liquide drainé (m_D) rapportée à la masse initiale de la mousse (m_M).

$$F = 100 \cdot \frac{m_D}{m_M} \quad [\%] \quad \text{Equation II.11.}$$

Inversement, la stabilité de la mousse peut être quantifiée par $St = 100 - F$ [%].

L'évolution de la stabilité au cours du temps traduit la durée de vie des mousses. Le temps de demi-vie (moment où le volume de mousse restant est égal à la moitié du volume maximal de mousse formée) peut être relié à l'ensemble des mécanismes de déstabilisation (drainage, disproportionnement, coalescence), alors que le temps de la première goutte ($t_{1^{\text{ère}} \text{ goutte}}$), i.e. le temps auquel débute le drainage, doit être privilégié pour estimer la stabilité des mousses contre le seul drainage. Toutes les mesures réalisées ont été répétées au moins trois fois pour chaque échantillon de mousse analysé.

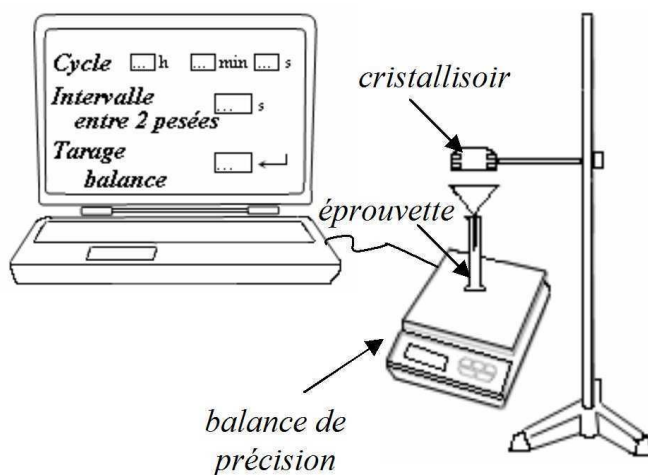


Figure II.18. Schéma du dispositif de drainage.

Stabilité à long terme

L'évolution de la stabilité à long terme a été étudiée principalement dans le cas du foisonnement en continu. Nous avons utilisé des tubes à centrifugation gradués (10 cm) dans lesquels nous avons mis la mousse dès sa sortie du foisonneur et la hauteur de la mousse a été mesurée par la suite à l'aide d'une règle. Les échantillons ont été entreposés dans un réfrigérateur à 4°C et des mesures de la hauteur de la mousse ont été effectuées après 18 h, 48 h et 72 h. Toutes les mesures réalisées ont été répétées au moins trois fois pour chaque échantillon de mousse analysé.

II.3.3. Rhéologie des mousses en mode dynamique

II.3.3.1. Détermination de la zone de linéarité

Le comportement linéaire d'un matériau est lié à son aptitude à supporter les contraintes auxquelles il est soumis par une réponse correspondant à des déformations parfaitement réversibles qui suivent la loi de Hooke. Contrainte et déformation sont donc reliées par une rigidité constante, indépendante de la déformation et de la durée de sollicitation, usuellement notée G lorsque la déformation est un cisaillement. Sous cisaillement, le domaine de linéarité est le plus souvent établi par un test en oscillation (mode harmonique). La rigidité G s'exprime alors

sous la forme d'un module complexe G^* tel que $G=|G^*|$ et $G^*=G'+i\cdot G''$. En général, la région linéaire d'un matériau est déterminée en augmentant progressivement la déformation imposée jusqu'à ce que la partie réelle du module élastique G' , constante dans la région linéaire, commence à décroître (figure II.19.), c'est-à-dire que la structure du matériau est irréversiblement altérée par la déformation subie.

Le domaine de linéarité permet de choisir des valeurs de fréquence et d'amplitude qui resteront constantes pour toutes les manipulations.

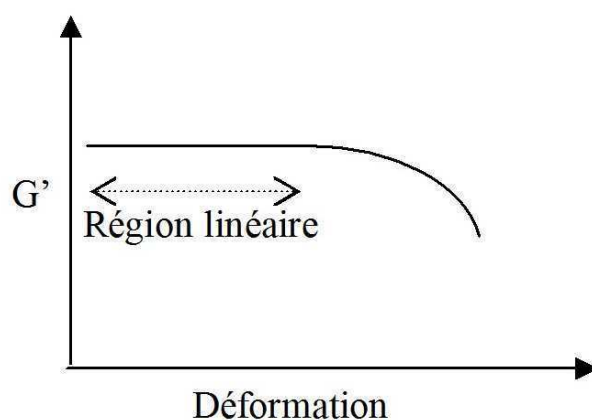


Figure II.19. Détermination de la zone de viscoélasticité linéaire par rhéologie dynamique.

G' est représenté en fonction de la déformation appliquée à l'échantillon.

Les mesures rhéologiques effectuées dans ce travail ont été réalisées grâce à un rhéomètre à contrainte imposée AR-1000 (TA Instruments, USA) équipé d'un système plan-plan piloté au moyen d'un logiciel (Figure II.20.). L'échantillon est déposé sur le support inamovible dont la température est régulée à 4°C par l'effet Peltier. La géométrie utilisée est de 4 cm diamètre et l'entrefer est fixé à 2 mm. Pour ce test, la fréquence des oscillations a été fixée à 1 Hz. Pendant la mesure, l'appareil effectue un balayage de déformation entre 0,1 et 10%, qui correspond à un déplacement angulaire du mobile par rapport à l'entrefer mobile/paroi fixe.

II.3.3.2. Mesures dynamiques

Les mesures rhéologiques ont été effectuées avec le même rhéomètre que précédemment (Figure II.20.). La déformation choisie est de 0,5%, valeur limite du domaine linéaire, car pour des valeurs supérieures, la mousse présente une modification structurale irréversible. Comme précédemment, l'échantillon est déposé sur le plan Peltier dont la température est régulée à 4°C, alors que l'entrefer est fixé à 2 mm. Nous avons choisi d'effectuer les mesures dynamiques en faisant varier la fréquence de 0,1 à 20 Hz. Les réponses mesurées sont les modules élastiques (G') et visqueux (G'') ainsi que la tangente de perte, $\tan \delta$, qui est le rapport G''/G' .

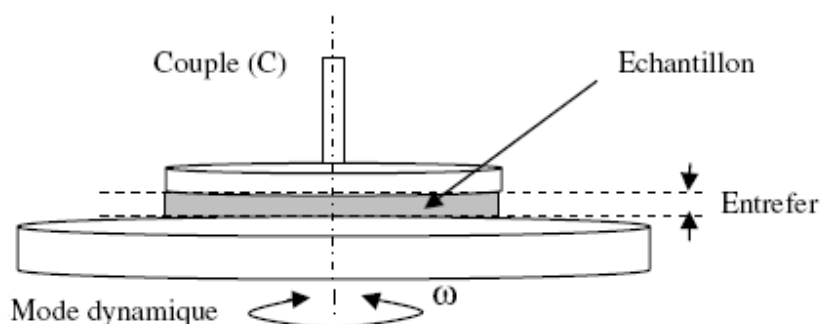


Figure II.20. Représentation schématique de la géométrie utilisée avec le AR-1000.

Des tests de balayages en temps ont ensuite été conduits pendant 30 minutes à 0,5% de déformation à une fréquence de 1 Hz dans le but d'analyser la stabilité de la texture des mousses. Toutes les mesures ont été répétées au moins trois fois pour chaque échantillon de mousse analysé.

Pour comparer la texture des mousses dans les mêmes conditions, nous avons utilisé la valeur du module élastique (G') à une déformation de 0,5% et une fréquence de 1 Hz à 4°C.

II.3.4. Analyse de la microstructure des mousses

Afin de mesurer la taille et la distribution de taille des bulles dans les mousses fabriquées, nous avons utilisé une technique d'analyse d'images reposant sur la microscopie optique. A cette fin, nous avons utilisé un microscope optique (LEICA, Leica Microsystem Wetzlar GmbH, Allemagne, objectif $\times 10$) relié à une caméra CCD pour la capture des images. Ces images ont ensuite été traitées par un logiciel de traitement d'images (Visilog 6.11 Noesis, France) afin

d'évaluer le diamètre moyen des bulles d'air, ainsi que la distribution des tailles au sein de la mousse.

En pratique, il convient de réaliser une préparation microscopique en déposant une petite quantité de mousse sur une lame de verre sans la recouvrir d'une lamelle. Pour obtenir une image de bonne qualité, il faut veiller à ce que la préparation ne soit pas trop épaisse. Ainsi, l'échantillon doit être délicatement étalé à l'aide d'une lamelle afin d'avoir une couche mince. Afin d'obtenir des estimations correctes des tailles de bulles, nous avons réalisé en moyenne 5 préparations et avons pris 6 clichés par préparation, soit donc environ 30 images par mousse produite.

Les clichés obtenus ont été analysés manuellement et un total d'approximativement 600 bulles ont été comptées pour chaque préparation. Les paramètres suivants ont été retenus pour l'analyse : les diamètres minimum et maximum des bulles de gaz, le diamètre moyen des bulles de gaz (diamètre de Sauter, Equation II.11.), ainsi que l'écart-type de la distribution de façon à caractériser sa dispersion. La distribution des tailles des bulles a été représentée sous forme cumulée.

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i d_i^3}{\sum_{i=1}^n n_i d_i^2} \quad \text{Equation II.12.}$$

II.3.5. Plan d'expériences

Afin d'évaluer l'erreur expérimentale ainsi que pour connaître l'effet de certains facteurs (concentration, force ionique, sucrose) sur les caractéristiques des mousses (taux de foisonnement, G' , $t_{1^{\text{ère}}}$ goutte, temps de demi-vie $t_{1/2}$, viscosité de la solution...), une approche de type « plan d'expériences » a été mise en place.

Dans un premier temps, nous avons décidé quels sont les facteurs contrôlés et leurs plages de variation :

- concentration en WPI entre 2-4 % w/v,
- force ionique entre 0 et 100 mM,
- teneur en saccharose entre 0 et 10%.

L'étape suivante a consisté à créer le plan factoriel. Nous avons choisi un plan composite centré isovariant par rotation dont les caractéristiques sont les suivantes : il est formé d'un plan factoriel à trois facteurs de 2^3 , d'un point central répété 5 fois pour estimer l'erreur pure et de $2 \times 3 = 6$ points en « étoiles » (Figure II.21.). Le point central correspond à une concentration de 3% WPI, une force ionique de 50 mM et un pourcentage massique de 10% saccharose.

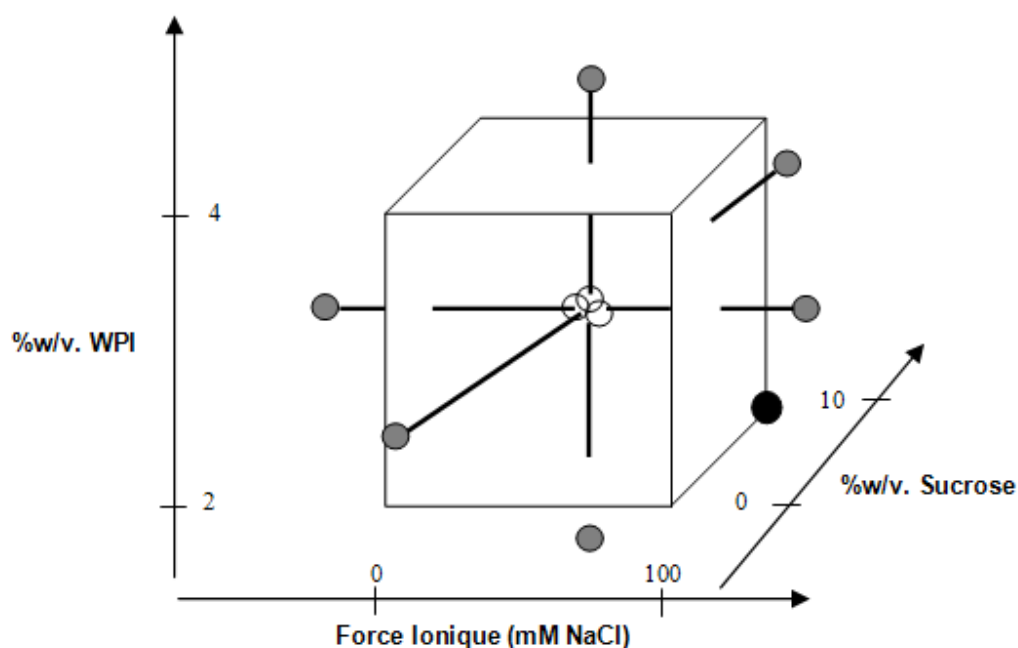


Figure II.21. Représentation schématique d'un plan centré composite à 3 facteurs, 3 points centraux et 6 points en "étoile".

A titre d'illustration, le Tableau II.1. présente la matrice expérimentale pour le plan factoriel complet 2^3 qui a servi de base au plan composite centré. Ensuite, l'effet de chaque facteur a été estimé séparément, ainsi que celui des interactions binaires entre facteurs par une analyse de la variance (ANOVA) grâce au logiciel Statgraphics Plus 5.0 (Tableau II.2.).

Chapitre 2. Matériel et techniques expérimentales

Tableau II.1. Matrice du design initial.

	<i>Protéines</i>	<i>Sel</i>	<i>Sucre</i>	<i>TF (%)</i>
1	2	0	0	952,5
2	4	0	0	1108,3
3	2	100	0	1063
4	4	100	0	1138
5	2	0	10	993,55
6	4	0	10	1033
7	2	100	10	1038,26
8	4	100	10	1059,2
9	3	50	5	1028,24

En parallèle, les effets des facteurs, des interactions et des termes quadratiques ont été obtenus par régression linéaire. L'ANOVA peut alors être utilisée pour simplifier le modèle en ne conservant que les termes du modèle statistiquement significatifs. A titre d'illustration, une table d'ANOVA est présentée dans le Tableau II.2.

Tableau II.2. Exemple d'ANOVA d'un plan factoriel complet 2^3 dans le cas du taux de foisonnement.

<i>Facteur</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Variance</i>	<i>F</i>	<i>p valeur</i>
A: Protéine	42392,9	1	42392,9	74,47	$<10^{-4}$
B: Force Ionique	22274,2	1	22274,2	39,13	$<10^{-4}$
C: Sucre	9504,07	1	9504,07	16,70	0,0003
AB	4935,71	1	4935,71	8,67	0,0064
AC	14538,5	1	14538,5	25,54	0,0000
BC	2393,97	1	2393,97	4,21	0,0498
Défaut d'ajustement	3678,77	2	1839,39	3,23	0,0546
Erreur pure	15938,3	28	569,22		

$$R^2 = 83,0 \%$$

$$\text{Statistique de Durbin-Watson} = 2,28$$

Dans une table d'ANOVA, les paramètres utilisés pour étudier l'influence des facteurs sont les suivants :

- ↳ F qui est le rapport de la variance du facteur sur celle de l'erreur pure compare la variabilité due au facteur à celle de l'erreur expérimentale. Un effet est significatif quand F est supérieur à la valeur théorique ; plus F est élevé, plus l'effet est significatif.
- ↳ La *p-valeur* est la probabilité que l'hypothèse « le facteur n'a aucun effet sur la réponse mesurée » soit vraie. Pour cette étude, un intervalle de confiance de 95% a été sélectionné. Ainsi, un effet est significatif quand sa *p-valeur* est inférieure à 5%. Elle est obtenue à partir de la valeur de F et d'une statistique de Fisher-Snedecor.
- ↳ Le *défaut d'ajustement du modèle* ou « *lack of fit* » estime si le modèle sélectionné est adapté pour décrire les données expérimentales. Il est testé comme les facteurs, à partir de F et d'une statistique de Fisher-Snedecor qui donne accès à sa *p-valeur*. En conséquence, sa *p-valeur* doit être supérieure à 0,05 pour que le modèle soit statistiquement significatif.
- ↳ La statistique de *Durbin-Watson* étudie les résidus (i.e. les différences entre les valeurs expérimentales et celle prédites à partir du modèle) et recherche la présence d'une corrélation significative entre les résidus. Si les expériences sont réalisées indépendamment, dans un ordre aléatoire, qu'il n'y a pas de déviation systématique et que le modèle est représentatif, les résidus ne doivent pas être corrélés et le paramètre de Durbin-Watson doit être proche de 2. En revanche, des valeurs inférieures à 1,4 indiquent une corrélation des résidus qui invalide le modèle.
- ↳ Le *coefficient de détermination* ou de *corrélation* R^2 mesure l'adéquation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites ; pour un modèle prédictif à but quantitatif, il doit être supérieur à 80%.

Chapitre 3.

Résultats et Discussion

I. CARACTERISATION DES SOLUTIONS DE *PROTEINES SÉRIQUES* (WPI)

L'objectif de cette première partie de notre étude est d'étudier le rôle des conditions du traitement thermique (température) et de la formulation (concentration en WPI, force ionique) afin de mieux contrôler les processus de dénaturation et d'agrégation des WPI, de manière à générer des agrégats protéiques dédiés à l'opération de foisonnement.

L'originalité de notre travail réside dans deux aspects :

- ✓ la formation des assemblages protéiques par traitement thermique en dynamique ;
- ✓ l'établissement d'une corrélation entre les propriétés physico-chimiques de ces assemblages et les propriétés des mousses.

I.1. EFFET COUPLE FORCE IONIQUE–TEMPERATURE DE DENATURATION

Dans le cadre de nos travaux, nous avons étudié le rôle de la force ionique à partir de différentes concentrations en sel (respectivement, 0 mM, 50 mM et 100 mM NaCl) sur les processus de dénaturation et d'agrégation des protéines sériques. Cette première partie de notre étude a été conduite sur une solution de WPI à 2% w/v à pH neutre, solution qui a subi un traitement thermique à une température de 100°C dans un échangeur tubulaire (Actijoule, France). La nécessité de cette étude est justifiée par le peu d'informations (*Mahmoudi, 2007*) disponibles à l'heure actuelle sur l'interaction entre d'une part les mécanismes physico-chimiques de la dénaturation/agrégation des protéines sériques induite par chauffage et d'autre part l'hydrodynamique des échangeurs de chaleur. De plus, on ne connaît que peu de choses sur l'impact du traitement dynamique sur la formation d'agrégats protéiques et sur le rôle de ces agrégats lors de la formation et la stabilisation des mousses. Les résultats expérimentaux présentés dans ce chapitre ont donc pour but de combler au moins partiellement les lacunes existant actuellement dans ce domaine.

Microcalorimétrie (μ -DSC)

Le degré de dénaturation des solutions protéiques a été quantifié par μ -DSC. La dénaturation des protéines de lactosérum est obtenue à partir d'un mécanisme complexe qui a été expliqué par *Schokker, Singh & Creamer (2000)*. Celui-ci a été décrit comme un processus en deux étapes. La première est endotherme ; elle consiste en un déplissement des protéines et elle est obtenue à la fois à partir d'une évolution de l'équilibre entre les dimères et les monomères natifs et non-natifs couplée à des arrangements intramoléculaires réversibles ou irréversibles (par exemple, la rupture des ponts hydrogènes...). La deuxième étape correspond à l'agrégation ; elle résulte principalement des échanges de ponts disulfures S-S et, plus rarement, de l'établissement d'interactions non-covalentes dont les liaisons hydrophobes. L'agrégation débute par la formation des dimères non-natifs et d'oligomères qui vont croître rapidement en fonction de l'environnement chimique et de la température appliquée, principalement par l'incorporation des monomères et des agrégats plus petits (*Le Bon, Nicolai & Durand, 1999*). La formation des liaisons hydrophobes et covalentes durant l'agrégation est légèrement exotherme (*Privalov & Khechinashvili, 1974 ; Ma & Harwalkar, 1991*). Toutefois, les deux étapes du processus ne peuvent pas être séparés, sauf dans quelques conditions très particulières de pH et de force ionique, mais qui sont très éloignées de nos conditions de travail (*Unterhalsberger et coll., 2006*). Par conséquent, seulement un pic endotherme est normalement visible, bien que celui-ci soit le résultat d'une combinaison de phénomènes endothermes et exothermes. Il en résulte que l'enthalpie de dénaturation des échantillons traités thermiquement est à peu près proportionnelle à la quantité de structures secondaires et tertiaires des protéines sériques dénaturées et peut donc indiquer la perte partielle de structure des protéines résultant du traitement thermique.

Sur la Figure III.1 sont présentés les thermogrammes obtenus pour les solutions protéiques étudiées dans le cadre de cette étude. Les résultats montrent qu'à partir d'une certaine concentration (dans notre cas, 100 mM, ce qui correspond à une force ionique élevée), la présence de NaCl protège les protéines sériques de la dénaturation. En conséquence, le degré de dénaturation n'est que de 10% dans le cas de la solution à 100 mM. En revanche, à faible force ionique, ce qui est le cas des deux autres formulations (absence de NaCl ou bien en présence de 50 mM NaCl), le degré de dénaturation est supérieur à 90%, ce qui correspond à une dénaturation quasi-complète des WPI.

De plus, l'addition de NaCl semble diminuer légèrement la température de dénaturation des protéines sériques. Nos résultats sont en accord avec ceux d'*Unterhalsberger et coll.*, (2006), mais ils sont en désaccord avec ceux de *Varunsatian et coll.* (1983). Ces derniers ont montré que la température de dénaturation déterminée par DSC pour une solution de WPC à 1% et à pH de 7,5 était 75,2°C en l'absence de NaCl, alors que la température de dénaturation était 76,5°C en présence de 25 mM NaCl. De même, ils ont rapporté qu'un traitement thermique en statique d'une durée de 5 minutes à 80°C en présence de 50 mM de NaCl conduisait à un degré de dénaturation des protéines sériques de 60%, alors que moins de 15% des protéines étaient dénaturées en l'absence de sel. Ce résultat met clairement en évidence la différence entre le traitement thermique en statique et le traitement thermique en dynamique, celle-ci résultant vraisemblablement des différences entre les conditions hydrodynamiques, de mélange et de transfert thermique appliquées dans les deux procédés (Tableau III.1.). En conséquence, la dénaturation ne dépend pas seulement de la force ionique, du pH, de la durée et de la température du traitement thermique, mais aussi de la technologie utilisée pour ce même traitement thermique.

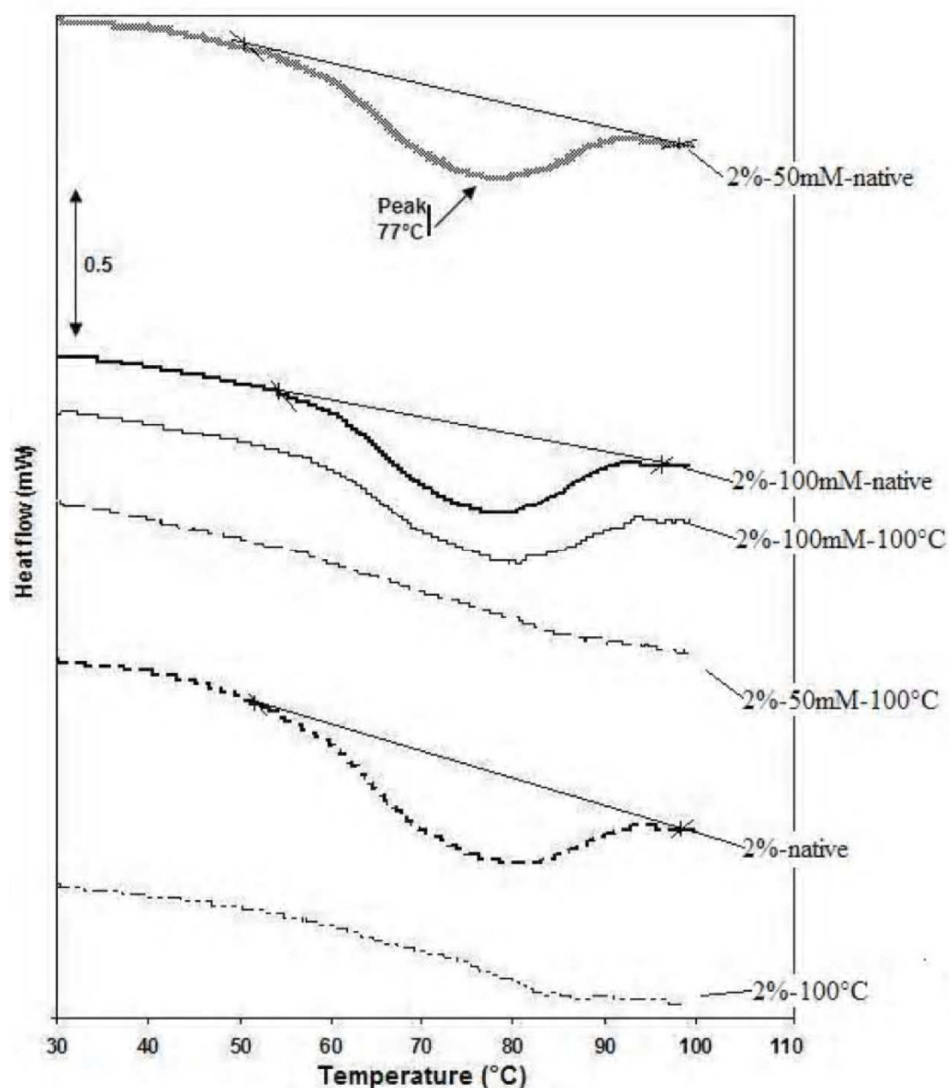


Fig. III.1. Thermogrammes des solutions protéiques natives ou traitées thermiquement à 100°C (avec ou sans addition de NaCl).

Centrifugation

Cette mesure a pour but de quantifier les agrégats insolubles dont la taille a été estimée supérieure à 1 μm . Le Tableau III.1. résume les résultats observés au cours des expériences de séparation par centrifugation et montre que des agrégats protéiques insolubles sont déjà présents dans les solutions à 2% w/v WPI, même pour les solutions de WPI natives (en raison du mode d'obtention de la poudre par l'ensemble des procédés), et que leur quantité augmente considérablement avec le traitement thermique, comme attendu à partir des mesures de μ -DSC.

L'ajout de NaCl semble réduire de manière significative la proportion d'agrégats insolubles, et ceci indépendamment du traitement thermique appliqué.

Tableau III.1. Propriétés des solutions protéiques avant et après traitement thermique, avec et sans sel.

<i>Echantillon</i>	<i>Degré de dénaturation par DSC (%)</i>	<i>Agrégats dans la fraction soluble par SEC (% w/w)</i>	<i>Agrégats insolubles par centrifugation (% w/w)</i>	<i>Diamètre moyen des agrégats solubles par DLS (nm)</i>
2%-native	-	-	2,9	220
2%-100°C	95,8	8	15,8	140
2%-50 mM-native	-	-	0,5	186
2%-50 mM-100°C	90	71	4,3	158
2%-100 mM-native	-	-	1,25	160
2%-100 mM-100°C	10	17	5,4	120

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La population des agrégats formés dans la fraction soluble a été étudiée par SEC sur les échantillons centrifugés. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme de courbes d'élution qui incluent les protéines natives aux temps (resp. volumes d'élution) élevés, ainsi que les agrégats protéiques solubles aux temps courts (Figure III.2.). Les pics aux temps d'élution longs (≈ 30 min.) correspondent aux protéines natives, avec ou sans sel. Après traitement thermique à 100° C, la courbe s'élargit vers des temps courts montrant ainsi l'apparition d'agrégats solubles. Les courbes d'élution ont démontré, comme prévu, que la proportion de protéines natives de lactosérum a diminué en faveur de la formation d'agrégats dans les échantillons qui ont été traités thermiquement à 100°C. Nos résultats montrent que la proportion d'agrégats obtenus par traitement thermique dans la fraction soluble augmente tout d'abord quand on ajoute du sel dans les solutions de WPI natives (Tableau III.1.). Toutefois, les calculs effectués par déconvolution à partir des pics chromatographiques ont démontré que les échantillons traités thermiquement en

l'absence de NaCl contenaient seulement 8% w/w environ d'agrégats protéiques solubles. En revanche, un ajout de 50 mM de NaCl favorise la formation d'une proportion beaucoup plus importante d'agrégats dans la fraction soluble (environ 70% w/w). Enfin, un ajout de 100 mM de NaCl conduit à la formation d'une proportion intermédiaire d'agrégats dans la fraction soluble (17% w/w), ce qui démontre à nouveau l'effet protecteur du NaCl à forte concentration. Contrairement à la fraction des protéines insolubles qui avait diminué lorsque du NaCl était ajouté (Tableau III.1.), la présence de NaCl renforce la formation des agrégats solubles.

En combinant ces résultats avec ceux de DSC (Figure III.1.), on peut conclure que non seulement la dénaturation des WPI est réduite par la présence de 100 mM NaCl, mais également que la taille des agrégats formés au cours du traitement thermique en mode dynamique est beaucoup plus faible et que ces agrégats restent essentiellement plus petits que 1 μm .

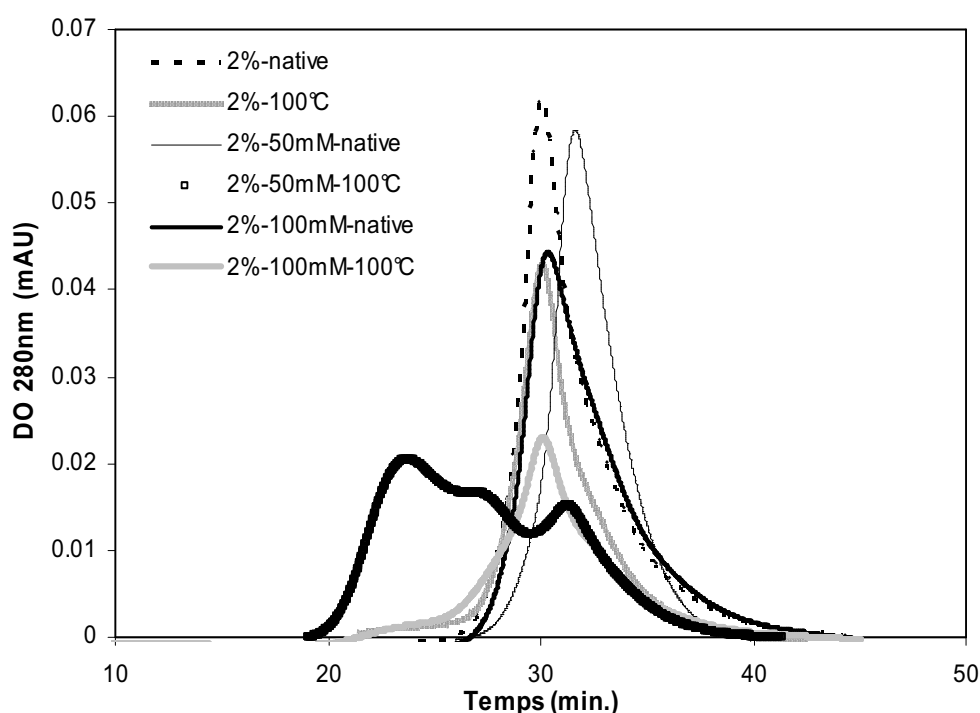


Fig. III.2. Courbes d'élution des solutions protéiques natives et traitées thermiquement à 100°C.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été utilisée sur les échantillons centrifugés pour analyser plus en détail l'évolution de la population des agrégats protéiques de la fraction soluble. L'influence du NaCl sur la dénaturation et sur l'agrégation des protéines sériques peut être expliquée par deux effets opposés. Tout d'abord, l'augmentation de la force ionique (de 0 mM à 100 mM) réduit les répulsions électrostatiques entre les protéines à pH 7,0 (effet d'*écrantage*), ce qui devrait favoriser l'agrégation des dimères et monomères des protéines sériques, bien que NaCl ait été signalé dans la littérature comme étant un co-soluté qui favorise très peu l'agrégation des protéines. Ce point a été souvent discuté pour la β -Lg (*Unterhalsberger et coll.*, 2006). Bien que la β -Lg native soit généralement présente sous la forme de dimères dans le lait (*Sakurai, Oobatake & Goto*, 2001; *Hambling, McAlpine & Sawyer*, 1992), des agrégats ont déjà été observés dans des solutions industrielles lorsque les WPI sont hydratés (*Bouaouina*, 2005), comme cela est confirmé par le Tableau III.1. En effet, la plupart des résultats de la littérature ont été obtenus sur des échantillons préalablement centrifugés (*Schokker, Creamer & Singh*, 2000) ou des solutions préalablement filtrées (*Croguennec, Kennedy & Mehra*, 2004).

Sur la Figure III.3., nous présentons les distributions de tailles des particules des échantillons centrifugés de WPI natives et également celles des WPI traités thermiquement à 100°C, l'ensemble étant obtenu par DLS. Les distributions sont bimodales dans le cas des trois solutions de WPI natives, indépendamment de la force ionique, avec un pic principal respectivement à 220 nm environ pour la solution sans NaCl, à 186 nm environ en présence de 50 mM NaCl et à 160 nm environ en présence de 100 mM NaCl. Les protéines sériques non-agrégées restent d'une taille inférieure à 7 nm dans les deux cas (absence ou présence de NaCl), ce qui est en accord avec la littérature sur les monomères et les dimères de β -Lg et de α -La (voir, par exemple, *Gimel, Durand & Taco*, 1994).

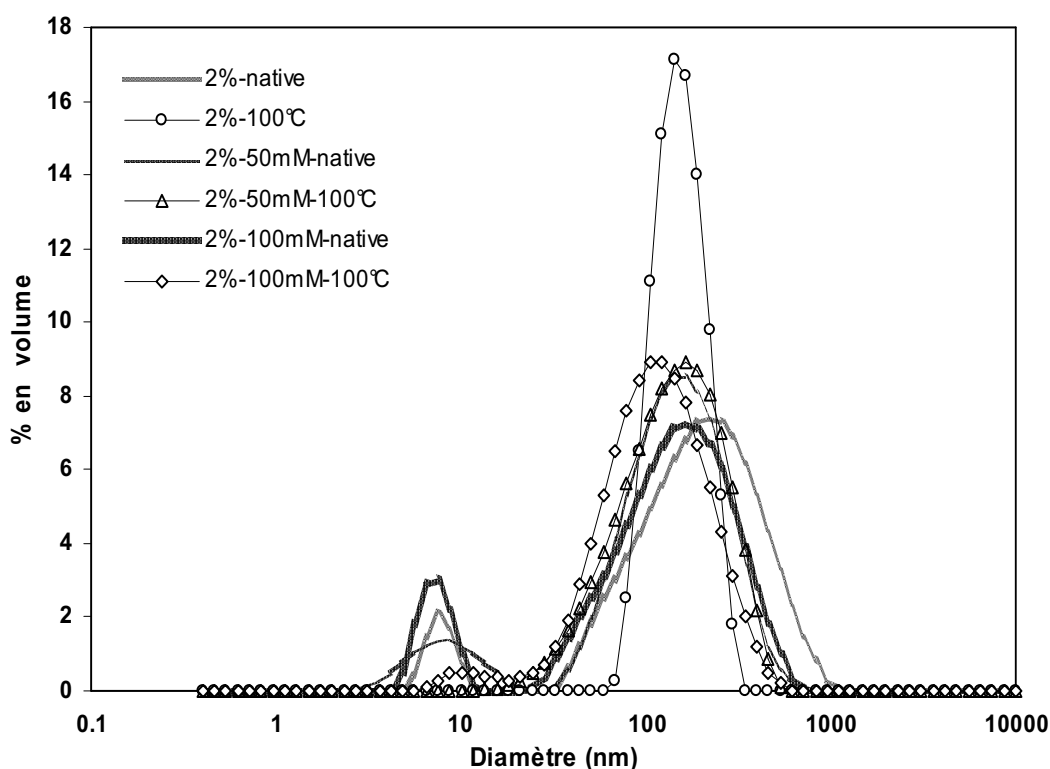


Fig. III.3. Distribution de tailles des particules dans des solutions protéiques natives et traitées thermiquement.

En revanche, la courbe obtenue par DLS à partir de l'échantillon de WPI, sans NaCl, traité thermiquement à 100°C, présente une distribution monomodale et uniforme des tailles avec un pic étroit à 140 nm ; elle diffère très fortement de la distribution des tailles obtenue pour des solutions de WPI non-traitées thermiquement, mais aussi de celle des solutions chauffées à 100°C en présence de 100 mM NaCl. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une dénaturation quasi complète des protéines observée sur la Figure III.1. Toutefois, la présence de NaCl dans les solutions de WPI combinée à un traitement thermique à 100°C présente un effet très significatif et les courbes de DLS témoignent d'un comportement intermédiaire entre les solutions de WPI natives et les solutions de WPI sans NaCl, toutes traitées thermiquement. Ce comportement intermédiaire que nous venons de rapporter se traduit par une diminution du pic représentant la distribution des particules de petite taille, ainsi que par une augmentation du pic correspondant à la distribution des particules présentant une taille supérieure à 50 nm (Figure III.2.). Cette forme est caractéristique d'une dénaturation en cours des protéines (Schokker, Singh & Creamer, 1999),

ce qui est en accord avec les résultats observés par μ -DSC et confirme également le rôle clef du traitement thermique en mode dynamique sur les mécanismes de dénaturation et d'agrégation thermique des WPI.

Par ailleurs, ces résultats peuvent également être expliqués par le deuxième effet lié à la force ionique, c'est-à-dire *l'effet de sel*, qui peut réduire l'agrégation lorsque les forces résultant de l'hydratation des protéines deviennent prépondérantes. Une telle situation a été signalée par Unterhalsberger et coll., (2006), même si ce phénomène dépend beaucoup de la nature du co-soluté, de sa concentration et de l'environnement chimique. A travers cette étude, nous avons pu constater en présence de NaCl que l'environnement ionique, ainsi que le type de traitement, tendent à renforcer la stabilité des agrégats de petite taille, plutôt qu'à favoriser la formation de gros agrégats insolubles (Tableau III.1.). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les mesures de chromatographie d'exclusion stérique présentés sur la Figure III.2. et ils sont également en accord avec les données résumées dans le Tableau III.1.

Conclusions

En conclusion, au travers de ce travail, nous avons démontré que la force ionique joue un rôle clef sur les dynamiques de la dénaturation et de l'agrégation des protéines dans les solutions de WPI à 2% w/v lors d'un traitement thermique dans un échangeur de chaleur tubulaire. Les données expérimentales ont montré que le traitement thermique à 100°C des solutions de WPI à faible force ionique (0 mM NaCl) a entraîné une dénaturation presque complète de celles-ci, tandis que les échantillons à forte force ionique (100 mM NaCl) traités à 100°C n'ont enregistré que 10% de dénaturation. De plus, l'ajout de NaCl semble diminuer légèrement la température de dénaturation des solutions de protéines sériques. En combinant les résultats obtenus par μ -DSC avec ceux obtenus par DLS, on peut conclure que non seulement la dénaturation est réduite par la présence de 100 mM NaCl, mais aussi que la taille des agrégats solubles formés au cours du traitement thermique est beaucoup plus petite et qu'elle reste majoritairement inférieure à 1 μ m. Un bilan matière sur la composition en protéines des échantillons après centrifugation, ainsi que les analyses par chromatographie d'exclusion stérique ont confirmé que la force ionique réduit toujours la proportion d'agrégats insolubles formés, mais également qu'elle favorise la formation d'agrégats solubles lorsque le traitement thermique est appliqué. En

effet, la proportion d'agrégats solubles est passée de 8% w/w à 71% w/w puis à 17% w/w lorsque la quantité de NaCl a été augmentée de 50 mM à 100 mM. En effet, nous avons observé l'existence d'un effet plus marqué à 50 mM, ce qui se traduit aussi par un pourcentage de dénaturation plus élevé. C'est cette force ionique qui sera retenue pour la suite de notre étude.

I.2. EFFET DE LA TEMPERATURE DE DENATURATION SEULE

Dans cette étude, des mesures de microcalorimétrie différentielle, de diffusion statique et dynamique de la lumière, de chromatographie d'exclusion stérique et de tension de surface ont été réalisées afin de déterminer la température optimale du traitement thermique dans le but de former des agrégats induits par la chaleur et également de mieux comprendre à terme le rôle de ces agrégats sur les propriétés physiques des mousses de WPI (*sous-chapitre II.4.*). L'étude a été menée sur une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C sur une solution de WPI à 2% w/v, à pH neutre, et pour une force ionique correspondant à 50 mM de NaCl.

Il est bien connu que la viscosité de la solution de WPI affecte fortement la formation de la mousse (voir, par exemple, *Holden, Aceto & Schoppet, 1964*). Toutefois, dans notre travail, des résultats préliminaires ont démontré que la viscosité des solutions protéiques n'est pas significativement modifiée par le traitement thermique (Tableau III.2.) et que, par conséquent, la viscosité de la phase continue ne devrait pas affecter la formation et les propriétés des mousses.

Microcalorimétrie (μ -DSC)

Tout d'abord, nous décrirons les résultats obtenus par des analyses de μ -DSC. Les thermogrammes de μ -DSC pour des solutions protéiques natives à 2% w/v et celles traitées thermiquement dans la gamme de température étudiée sont présentés sur la Figure III.4.

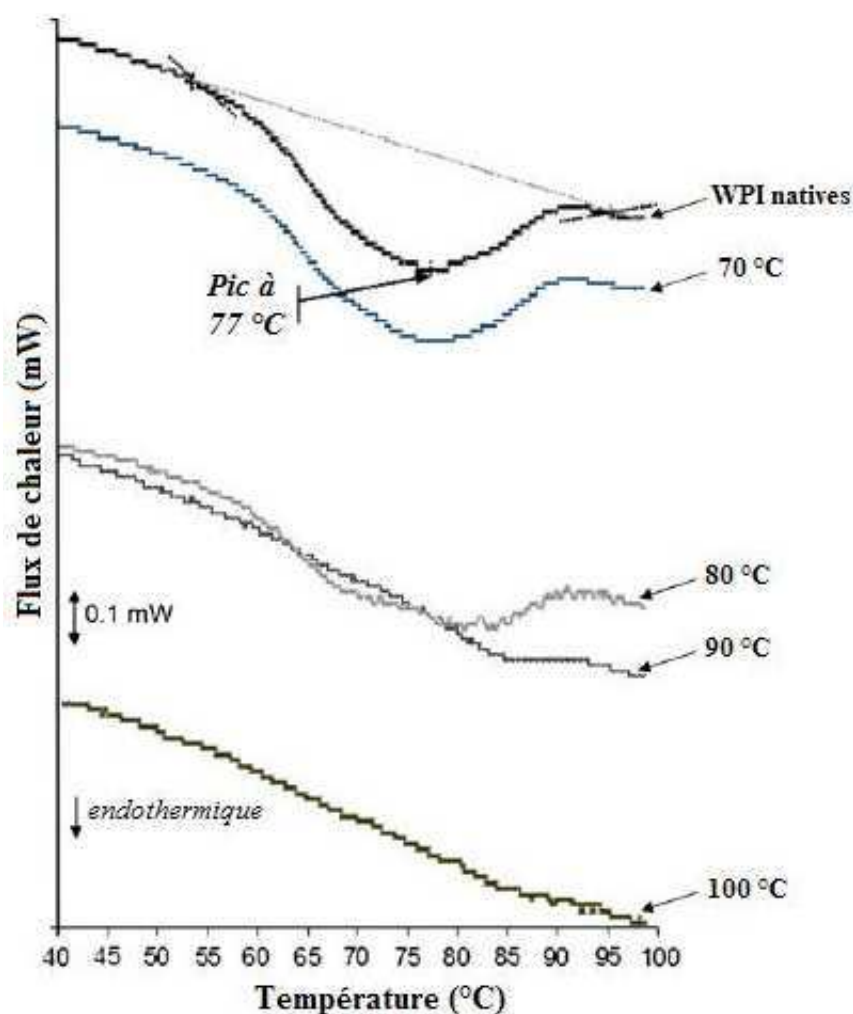


Fig. III.4. Thermogrammes des solutions protéiques natives ou traitées thermiquement dans une gamme de température entre 70°C et 100°C.

En effet, la μ -DSC est connue comme l'une des principales techniques employées pour la détermination du comportement thermodynamique des protéines. Dans ces expériences, l'évolution de la chaleur absorbée par les protéines en fonction de la température peut être principalement attribuée à leur dénaturation. En conséquence, l'enthalpie résultant de la dénaturation et du déplissement des protéines (obtenue par intégration du flux de chaleur sur le pic endotherme), la différence de chaleur spécifique entre les espèces protéiques déplissées et replissées ainsi que la température moyenne à laquelle le déplissement a lieu peuvent être déterminées à partir des thermogrammes (Schellman, 1987). Les propriétés thermiques des protéines sériques purifiées, telles que la β -Lg et l' α -La ont déjà été étudiées en détail par

μ -DSC (de Wit & Klarenbeek, 1984; Paulsson & Dejmek, 1990 ; Ju, Hettiarachchy & Kilara, 1999). Par exemple, à pH neutre, la température de dénaturation de la β -Lg est d'environ 78°C (Paulsson & Dejmek, 1990).

Dans notre étude, les résultats obtenus par microcalorimétrie révèlent que pour les solutions protéiques natives ou traitées thermiquement à 70°C, les valeurs de l'enthalpie restent identiques à la précision près des mesures. En revanche, au-dessus de 80°C, une diminution de la valeur de l'enthalpie de 10,31 J/g (cas des échantillons traités à 70°C) à 0,99 J/g (cas des échantillons traités thermiquement à 100°C) a été observée. La Figure III.4. montre que pour la solution de WPI qui a subi un traitement thermique à 70°C, la dénaturation est restée négligeable. Un pic de dénaturation est apparu autour de 77°C, comme pour les protéines natives. Au contraire, la dénaturation des WPI est quasiment complète pour les traitements thermiques à 90°C et à 100°C. Il semblerait donc que le processus de dénaturation des WPI ait débuté pour le traitement thermique à 80°C, ce qui correspond à un degré de dénaturation de 28% (Tableau III.2.). Dans la littérature, des résultats similaires ont déjà été obtenus par μ -DSC pour d'autres types de protéines, telles que les protéines de soja (Tang, Choi & Ma, 2007) et les protéines de blanc d'œuf (van der Plancken, van Loey & Hendrickx, 2006). Le Tableau III.2 regroupe les niveaux de dénaturation obtenus par μ -DSC et également les résultats sur les fractions respectives soluble et insoluble obtenus par SEC, DLS et centrifugation.

Tableau III.2. Propriétés des solutions de WPI (2%-50 mM) natives et traitées entre 70–100°C.

<i>Solution</i>	<i>Viscosité (Pa.s)</i>	<i>Degré de dénaturation par DSC (%)</i>	<i>Agrégats solubles par SEC (% w/w)</i>	<i>Diamètre moyen par DLS (nm)</i>	<i>Agrégats insolubles par centrifugation (% w/w)</i>
native	0,0067	-	-	186	0,5
70°C	0,0068	-	-	143	2,0
80°C	0,0063	28	10	132	6,3
90°C	0,0069	85	50	122	10,0
100°C	0,0071	90	71	158	4,3

Les mesures après centrifugation confirment également que la proportion d'agrégats insolubles a augmenté fortement lorsque la température du traitement thermique a été portée à 80°C et à 90°C (Tableau III.2.), comme attendu à partir de la Figure III.4. si l'on suppose que la dénaturation et l'agrégation sont couplées. En effet, Morr & Josephson (1968) ont signalé qu'à

pH neutre, les protéines dénaturées par la chaleur interagissent via des réactions irréversibles thiol-disulfure afin de former des agrégats protéiques qui, par la suite, vont se regrouper sous la forme de grosses particules qui vont finalement sédimenter. *Barlow, Hardham & Zadow (1984)* ont également souligné que lorsque le traitement thermique est réalisé dans des conditions trop favorables à l'agrégation des protéines, la production de gros agrégats sédimentables peut constituer un problème critique. Il faut cependant noter que nos données expérimentales ont démontré que la proportion d'agrégats insolubles diminue soudainement lorsque le traitement thermique est conduit à 100°C (Tableau III.2.). Nous allons tenter de mettre en relation ce résultat surprenant avec l'évolution de la distribution des tailles de particules mesurées en fonction de la température du traitement thermique par diffusion de la lumière (Figure III.5.) ; celle-ci va être décrite plus en détail dans le paragraphe suivant.

Diffusion statique de la lumière

La Figure III.5. décrit la distribution de taille des particules dans les solutions de WPI étudiées et montre tout d'abord que des agrégats insolubles sont déjà présents même dans les solutions de WPI natives, avec un diamètre moyen d'environ 50 μm . En revanche, on notera l'absence d'agrégats solubles (i.e. dont la taille est inférieure à 1 μm). Après un traitement thermique des solutions de WPI à 70°C, un pic correspondant aux agrégats solubles apparaît à environ 300 nm. Celui-ci peut tout d'abord être attribué à un début d'agrégation des protéines natives, bien que le processus de dénaturation soit resté négligeable sur la Figure III.4. En effet, la fraction de protéines insolubles a augmenté (Tableau III.2.). Les agrégats formés seraient donc plus petits, ce qui explique aussi le fait que le pic des agrégats insolubles (situé vers 50 μm pour les protéines natives) se soit déplacé vers les tailles plus petites (Figure III.5.). Une autre explication possible de ces deux observations est l'impact du traitement mécanique couplé au traitement thermique sur l'agrégation des protéines à 70°C dans l'échangeur de chaleur ; en effet, celui-ci peut favoriser la rupture des agrégats.

Etonnamment, la distribution de tailles des particules suite au traitement thermique à 80°C est restée similaire à celle obtenue pour un traitement thermique à 70°C, bien que les comportements de dénaturation soient sensiblement différents (Figure III.4.). Cela démontre que si la proportion d'agrégats protéiques augmente avec la température de traitement, les proportions

entre les classes de taille sont pratiquement conservées et le mécanisme d'agrégation est donc resté quasiment le même dans les deux cas. Au contraire, pour un traitement thermique à 90°C, la fraction de gros agrégats sédimentables (entre 100 et 300 µm) a fortement augmenté, en accord avec le Tableau III.2. Un comportement atypique est observé pour un traitement thermique à 100°C : tout d'abord, il y a une augmentation de la fraction d'agrégats solubles dont la taille est d'environ 300 nm (Figure III.5.), mais cette fois au détriment des gros agrégats insolubles ; en particulier, les agrégats insolubles dont le diamètre est supérieur à 100 µm ont disparu.

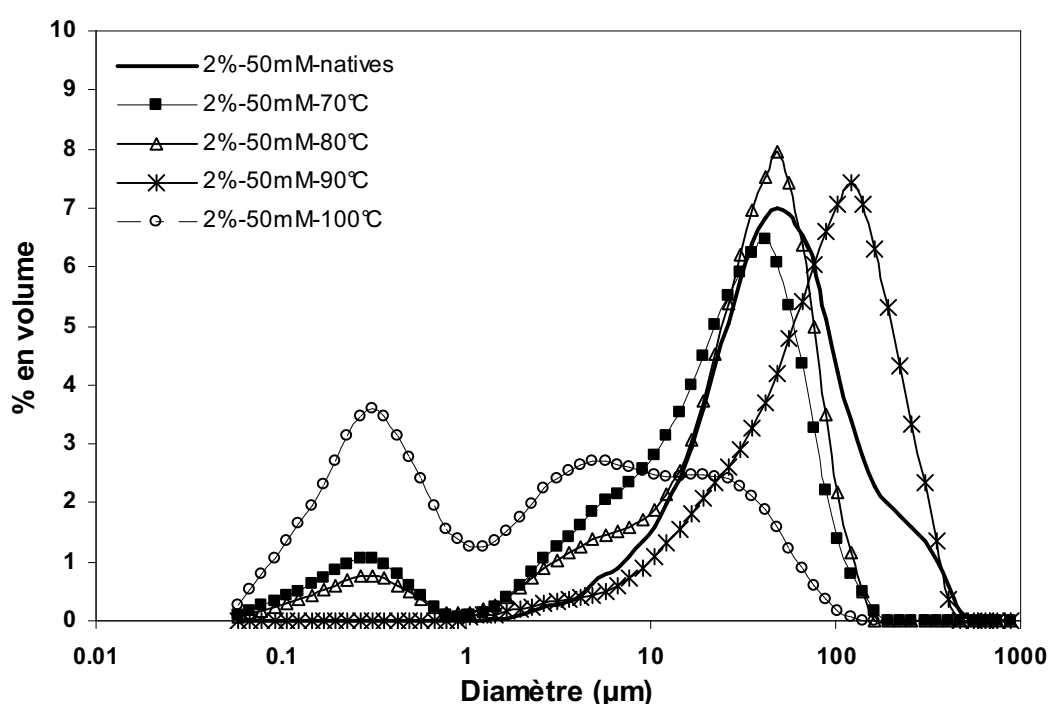


Fig. III.5. Distribution de tailles des particules par granulométrie laser dans des solutions de WPI natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

Ces résultats mettent en évidence le fait que la dénaturation et l'agrégation peuvent être partiellement dissociées en fonction du traitement thermomécanique appliqué et que les mécanismes d'agrégation peuvent différer fortement lorsque la température du traitement thermique est portée de 80°C à 100°C. Nos résultats sont en accord avec la littérature : par exemple, *Gotham et coll. (1992)* et *Cayot & Lorient (1998)* ont remarqué que la dénaturation et

l'agrégation peuvent être partiellement séparés lors de mesures réalisées au-dessus d'une certaine gamme de pH. Cela constitue une raison supplémentaire pour étudier l'impact du traitement thermique dynamique sur les solutions de WPI, en particulier dans le but d'obtenir un meilleur contrôle des propriétés, telles que la taille, la proportion et la forme des agrégats protéiques dédiés à la formation et à la stabilisation d'une mousse laitière.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Des mesures de DLS sur des échantillons centrifugés ont été réalisées afin d'effectuer une analyse plus détaillée de l'agrégation des particules de taille inférieure à 1 μm . En effet, cela nous a permis de mieux comprendre l'évolution de la population des agrégats solubles. Les diamètres moyens des distributions granulométriques obtenues par DLS sont reportés dans le Tableau III.2. Toutefois, ces valeurs « moyennes » masquent le fait que les distributions sont bimodales. En effet, les dimères des protéines de WPI natives présentent généralement un diamètre moyen de 8 nm (Mourouzidis-Mourouzis & Karabelas, 2006) qui apparaît clairement sur la Figure III.6. pour les protéines natives. Toutefois, même pour celles-ci, le pic représentant les dimères est accompagné par un plus grand pic correspondant aux agrégats solubles qui est caractérisé par un diamètre moyen d'environ 160 nm. Celui-ci correspond probablement au pic trouvé autour de 300 nm par mesures granulométriques classiques (Figure III.5.), tout simplement parce que le granulomètre standard tronque la distribution en taille des particules en éliminant tout ce qui est inférieur à environ 50 nm, alors qu'au contraire, la DLS limite la distribution de taille des particules aux dimensions inférieures à 1 μm . Les résultats expérimentaux montrent également que l'augmentation progressive de la température du traitement thermique favorise l'agrégation des petites particules et la formation d'agrégats solubles autour de 160 nm de diamètre. Pour un traitement thermique conduit respectivement à 90°C et à 100°C, les distributions en taille présentent une forme à peu près monomodale. Ceci est en accord avec les résultats illustrés par la Figure III.4. pour laquelle une dénaturation complète a été observée sur les échantillons traités à 90°C et à 100°C. En particulier, on doit mentionner que l'agrégation débute apparemment vers 70°C, ce qui est également en accord avec les résultats présentés sur la Figure III.5., même si cela n'avait pas été détecté par μ -DSC sur la Figure III.4.

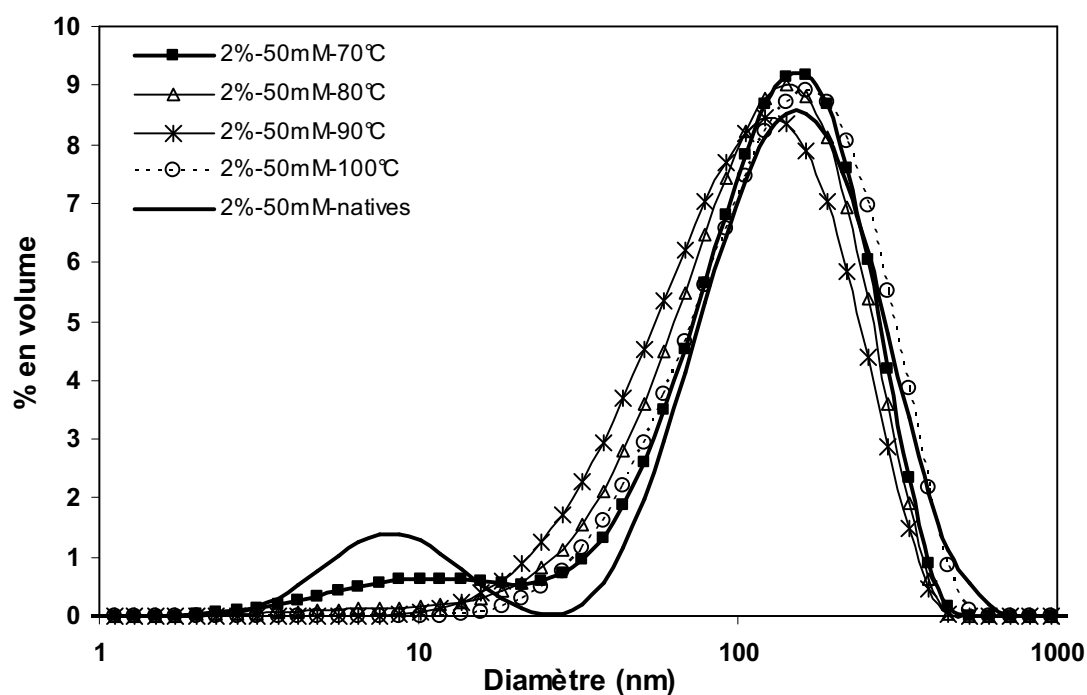


Fig. III.6. Distribution de tailles des particules par DLS dans des solutions de WPI natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La population des agrégats solubles dans des échantillons protéiques centrifugés a été également étudiée en utilisant la SEC. Cette technique permet de mesurer la quantité de protéines natives résiduelles et de protéines dénaturées non-agrégées formées suite au traitement thermique choisi. La Figure III.7. compare les courbes d'élution obtenues pour les WPI natives et un échantillon traité à 100°C. Toutefois, la DLS étant plus sensible que la SEC pour la détection des petits agrégats solubles, tels que les dimères, l'obtention des deux pics trouvés par DLS à partir de la Figure III.8. a nécessité une procédure de déconvolution. On notera qu'en revanche, la SEC s'est montrée plus sensible dans le cas des gros agrégats solubles. En conséquence, des modifications peu visibles du pic centré aux alentours de 160 nm sur la Figure III.8. ont été quantifiées par SEC grâce au fait que le temps d'élution des agrégats diminue lorsque leur taille augmente ou que leur morphologie change. Après un traitement thermique à 100°C, la Figure III.7. met l'accent sur la présence de deux populations d'agrégats solubles dont les pics apparaissent respectivement à 22,5

min et à 27,5 min. Ceux-ci représentent respectivement 43% w/w et 28% w/w de la fraction soluble des protéines, ce qui correspondrait à la proportion de protéines polymérisées de 71% dans la fraction soluble des protéines pour le traitement thermique à 100°C.

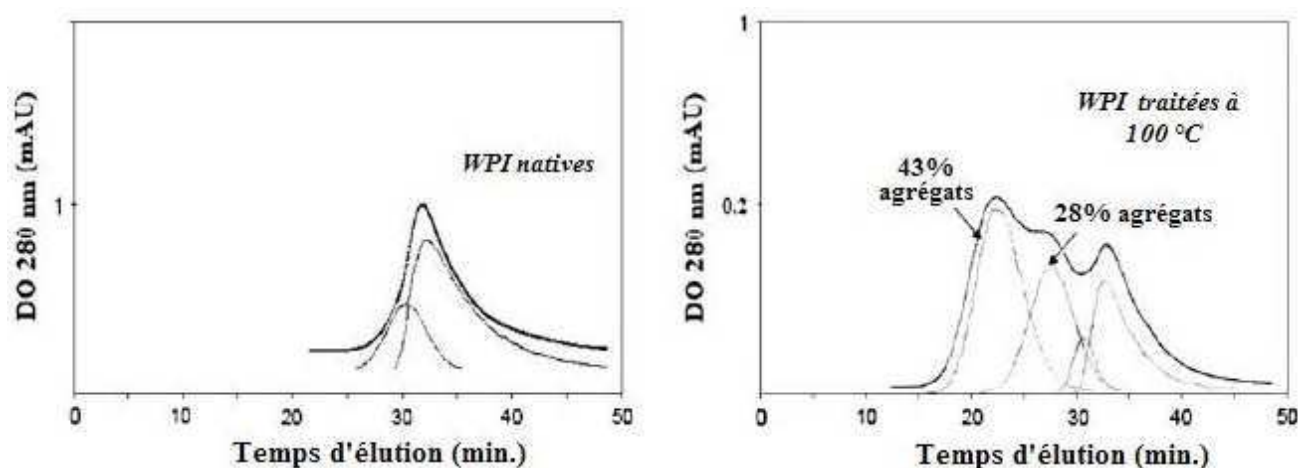


Fig. III.7. Courbes d'élution des solutions protéiques natives et traitées thermiquement à 100°C.

L'évolution des courbes d'élution en fonction de la température du traitement thermique est résumée sur la Figure III.8. Nous avons pu constater que la fraction soluble des WPI n'a pas été affectée par le traitement thermique effectué à 70°C, ce qui signifie que les agrégats formés ont été soit insolubles (comme le montre le Tableau III.2.), ou bien qu'ils sont caractérisés par une taille intermédiaire entre les deux pics présents dans les solutions de WPI natives, ce qui est en accord avec les données de DLS présentées sur la Figure III.6. En conséquence, la formation d'agrégats solubles de poids moléculaires plus élevé que dans les solutions de WPI natives débute à 80°C par la production d'environ 10% d'agrégats solubles présentant un diamètre moyen de 130 nm.

L'évolution de la proportion de la fraction résiduelle des WPI natives, ainsi que celle de la quantité d'agrégats solubles a pu être déduite en fonction de la température du traitement thermique appliqué ; elle est illustrée par la Figure III.8. Cette fraction diminue de 90% dans le cas d'un traitement thermique à 80°C à 29% pour un traitement thermique réalisé à 100°C. Une croissance particulièrement importante de la quantité d'agrégats solubles a été observée lorsqu'on passe de 80°C à une température de traitement de 90°C, correspondant à la formation d'environ 40% w/w d'agrégats dans la fraction soluble. Ce résultat était cependant attendu à partir de ceux

observés précédemment par μ -DSC et DLS. Les valeurs obtenues sont résumées dans le Tableau III.2.

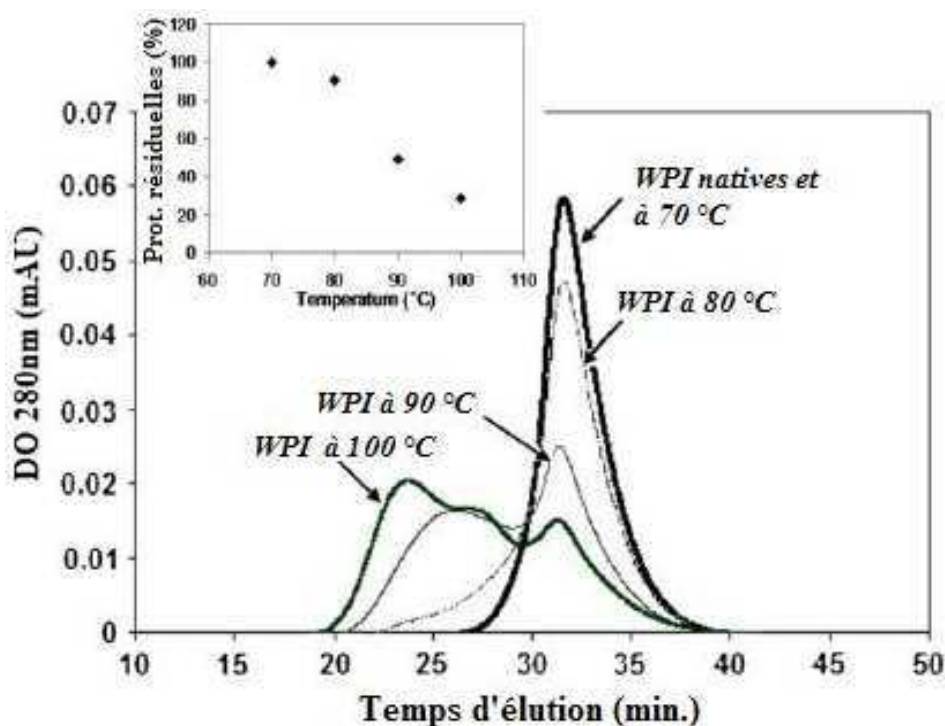


Fig. III.8. Evolution des courbes d'élution des solutions protéiques natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C (graphique inséré : % des protéines natives résiduelles dans les surnageants).

Microscopie

A travers les résultats expérimentaux précédents, nous avons montré que la taille, ainsi que la proportion en agrégats protéiques solubles et insolubles peuvent varier considérablement en fonction du traitement thermique appliqué. Dans cette partie de notre étude, une attention particulière va être accordée à la morphologie de ces agrégats, ainsi qu'à l'établissement d'une possible relation entre les paramètres taille/forme/proportion, et ce dans le but de mieux comprendre par la suite le rôle individuel de chacun de ces paramètres sur la formation et la stabilisation des mousses protéiques.

L'effet spécifique du traitement thermique sur la morphologie des agrégats insolubles est illustré par des images obtenues par microscopie optique au moyen du Sysmex FPIA-3000 Flow Particle Image Analyzer (ou FPIA-3000) pour les agrégats de taille inférieure à 200 μm et par microscopie optique dans l'alternative (Figure III.9.), alors que les agrégats protéiques solubles formés par traitement thermique ont été étudiés à partir de photos obtenues à l'aide d'un microscope à force atomique ou AFM (Figure III.11.).

Pour les agrégats protéiques localisés dans la fraction insoluble, les deux techniques d'analyse d'images employées nous ont permis d'observer que quelle que soit la température du traitement thermique, des agrégats très ramifiés et très cohésifs ont été formés. On remarquera que les agrégats insolubles les plus gros et les plus ramifiés ont été obtenus dans le cas de la solution de WPI traitée à une température de 90°C (Figure III.9.) qui était déjà celle pour laquelle la quantité d'agrégats insolubles était la plus élevée d'après les résultats précédents (Tableau III.2.). Les agrégats formés à une température de 90°C se montrent non seulement plus gros (visibles à l'œil nu), mais ils présentent également une structure très dense (Figure III.9.). En pratique, l'analyse d'images a permis de détecter deux populations d'agrégats (Figure III.9.) qui sont masquées en granulométrie laser par le fait que seuls des diamètres moyens en volume sont mesurés, ce qui sur-estime les tailles les plus élevées :

- dans le cas d'un traitement thermique effectué respectivement à 80°C et 100°C : une première population correspondant à des « gros » agrégats insolubles (caractérisés par des diamètres moyens respectifs de 70 μm et de 80 μm) et une deuxième population correspondant à des « petits » agrégats insolubles (avec des diamètres moyens respectifs d'environ 10 μm et 20 μm).
- dans le cas d'un traitement thermique effectué à 90°C : une première population correspondant à des « gros » agrégats insolubles dont le diamètre moyen est proche de 600 μm et une deuxième population correspondant à des « petits » agrégats insolubles avec un diamètre d'environ 200 μm .

Ceci indique que des températures de traitement thermique supérieures à 90°C favoriseraient plutôt la formation de nouveaux polymères protéiques que l'agrégation des agrégats déjà présents dans la solution. A nouveau, nos résultats expérimentaux nous ont permis de remarquer les différences importantes entre les effets du traitement thermique à 90°C et ceux observés après des traitements à 80°C ou à 100°C.

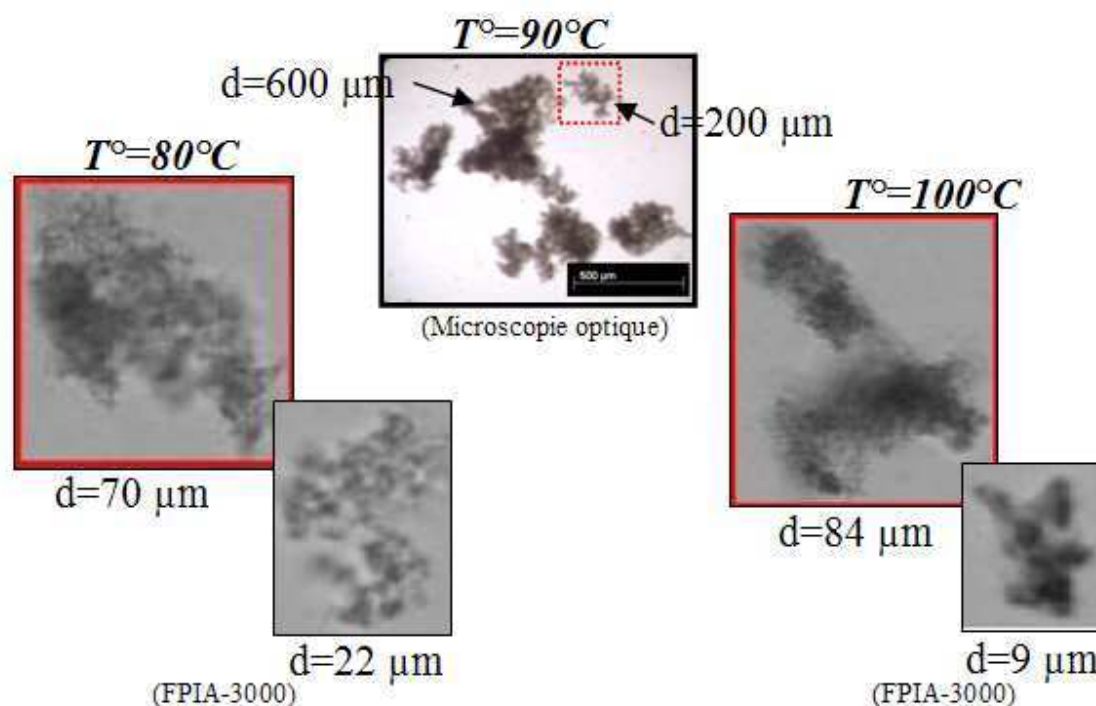


Fig. III.9. Images des agrégats insolubles obtenus pour des solutions de WPI traitées thermiquement entre 80°C et 100°C.

Nos résultats expérimentaux sont en accord avec ceux obtenus à partir des mesures de diffusion statique de la lumière (Figure III.5.) qui montrent clairement que la distribution des particules est multimodale. Ils sont également en accord avec la littérature. Par exemple, *Akkermans et coll. (2008)* ont montré par TEM que des agrégats compacts et opaques ont été générés par traitement thermique en statique à une température de 90°C dans une solution de WPI à 2,8 % w/v et pour un pH entre 5 et 7. De même, *Spiegel (1999)* a affirmé qu'afin de former des agrégats de protéines sériques avec des tailles comprises entre 0,5 et 10 μm, les solutions de WPI devraient être chauffées à 80°C–85°C pendant 1 ou 2 minutes. Par conséquent, dans ces conditions thermiques, un degré de dénaturation élevé a été obtenu et les agrégats produits ont présenté une structure très compacte et très stable. *Spiegel (1999)* a conclu que ces agrégats pourraient être utilisés afin d'améliorer la texture de la crème glacée, des desserts ou des produits lactés fermentés, puisqu'une sensation en bouche d'onctuosité et de crémeux est atteinte lorsque les diamètres des particules sont inférieurs à 10 μm ; en revanche, des températures plus élevées ou bien des durées de traitement thermique plus longues conduisent à la formation d'agrégats très

solides et grossiers, présentant des diamètres d'environ 100 μm , en accord avec nos données expérimentales, ce qui résulte en une sensation en bouche de type « sableux » lors de la consommation des aliments.

La fraction d'agrégats solubles dont la caractérisation a été réalisée par AFM (Figure III.10.) a montré un étalement important et la formation d'un film (d'environ 6 nm d'épaisseur) à la surface du support utilisé lorsque la solution de WPI a été placée sur un mica hydrophile. En revanche, lorsque la solution de WPI a été déposée sur un support en graphite hydrophobe, les agrégats se sont moins bien étalés en restant plutôt bien individualisés. Comme la Figure III.10. permet de le voir, ces agrégats sont plutôt allongés et légèrement branchés (270×130 nm). En effet, sur la Figure III.10., nous pouvons observer sur le mica hydrophile la formation d'un film homogène de petits objets issus de l'étalement des protéines et de la fracture des plus gros agrégats au sein desquels on trouve seulement quelques noyaux durs (50×6nm). Nos résultats se montrent en accord avec les données présentées par *Grácia-Juliá et coll. (2008)* en mesurant l'effet de l'homogénéisation haute pression : ces auteurs ont affirmé que dans le cas des échantillons de WPI non-traités, ainsi que des échantillons traités à 200 MPa, les particules ont été distribuées d'une manière homogène sur des supports en mica. Ces résultats sont également en bon accord avec les travaux de *Mahmoudi et coll. (2006)*. Ces auteurs ont montré que l'agrégation des WPI induite par traitement thermique à pH neutre est un mécanisme en deux étapes : la première étape correspond à la formation des agrégats primaires (~20 nm de diamètre) et la deuxième consiste en l'association des agrégats primaires, en conduisant ainsi à la formation des agrégats de tailles comprises entre 25 et 700 nm. Il faut également préciser que lors des mesures réalisées par microscopie à force atomique (Figure III.10.) l'ensemble de ces objets se sont montrés stables à la dilution, puisqu'aucune désintégration des agrégats solubles n'a été observée lors de la manipulation.

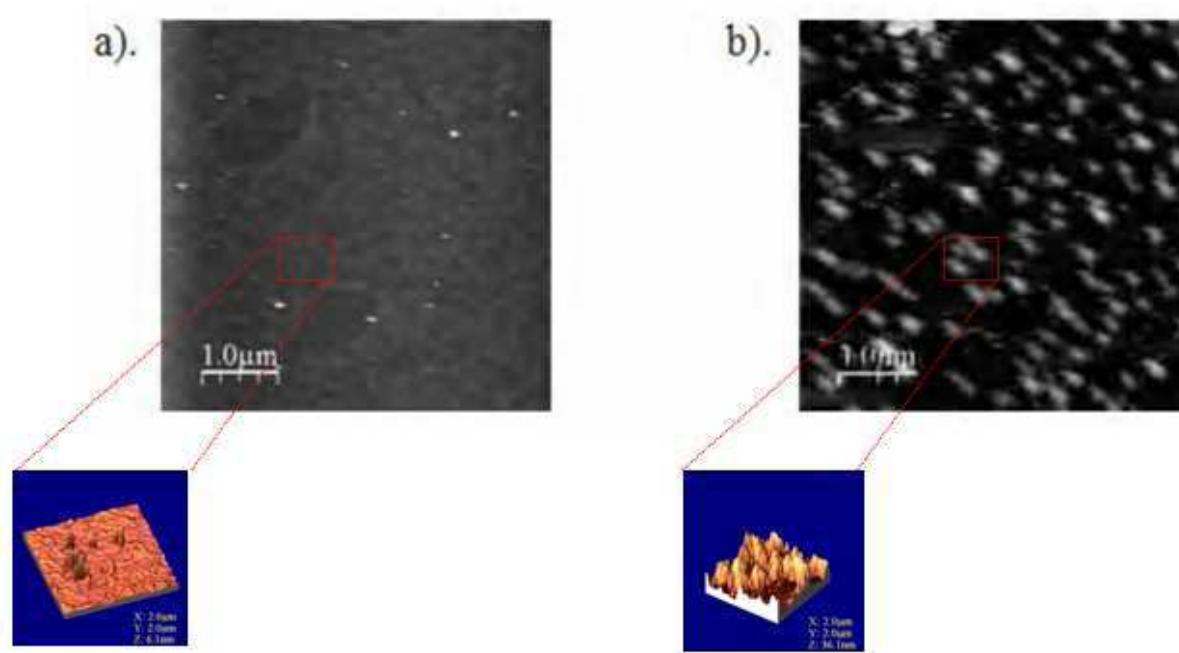


Fig. III.10. Images des agrégats solubles obtenus pour une solution de WPI traitée thermiquement à 90°C en fonction du support utilisé : a) support hydrophile en mica ; b) support hydrophobe en graphite.

En conclusion, nos résultats expérimentaux confirment non seulement que des agrégats solubles ou insolubles peuvent être produits de façon contrôlée par un traitement thermique dynamique, mais ils fournissent également plus d'informations sur le processus de formation des agrégats à partir des différentes sous-fractions protéiques. Selon la littérature, dans la fraction soluble, pendant le traitement thermique dynamique, des protéines dénaturées sont générées et une partie d'entre elles vont former des agrégats primaires liés par des ponts disulfures ; entre-temps, ces agrégats primaires ont tendance à se réassocier et à former des agrégats solubles plus gros, voire même des agrégats insolubles par des liaisons hydrophobes. C'est le mode d'association ainsi que la proportion d'agrégats primaires formés dans la solution de WPI, qui sont fortement reliés au traitement thermique appliqué (Tableau III.2). Toutefois, seule la proportion d'agrégats solubles augmente d'une façon monotone avec la température dans le Tableau III.2. : la fraction insoluble et la taille des agrégats ne présentent pas de tendance monotone avec le traitement thermique. En effet, l'instabilité des agrégats solubles dépend fortement des changements qui ont lieu au niveau de l'exposition au milieu des agglomérats hydrophobes, mais aussi au niveau des interactions

non-covalentes et covalentes entre protéines. Ces dernières sont fortement affectées par la température, comme par exemple les liaisons hydrophobes, ioniques, électrostatiques ou bien les ponts disulfures. Maintenant, afin de mieux comprendre la relation entre la taille des agrégats et les interactions moléculaires, des analyses par SDS-PAGE ont été conduites sur nos échantillons de protéines sériques.

Electrophorèse SDS-PAGE

Les échantillons des solutions de WPI natives et traitées thermiquement entre 70°C et 100°C ont été analysés par électrophorèse en l'absence et en présence de 2- β -mercaptoéthanol (β -ME). La présence de β -ME nous a permis d'évaluer la contribution des ponts disulfures sur la formation des agrégats protéiques dans la fraction soluble, ainsi que dans la fraction insoluble. On rappelle que les principales protéines présentes dans les WPI natives sont la β -Lg et l' α -La, suivies par la BSA et d'autres espèces protéiques présentes en quantités bien plus faibles (*Gràcia-Julià et coll., 2008*).

Lorsque l'électrophorèse des solutions de WPI a été effectuée en l'absence de β -ME (conditions non-réductrices), nous avons observé dans le cas des échantillons traités thermiquement que seulement une partie des protéines solubles (notamment les fractions monomériques) ont réussi à pénétrer dans le gel de concentration, alors que les fractions insolubles (notées A sur la Figure III.11.) n'ont pas pu entrer dans le gel de concentration et ont formé des dépôts en haut de ce gel. Ceci indique que la masse moléculaire de ces polymères protéiques est supérieure à 10³ kDa (*Utsumi et coll., 1984*). Dans le cas de la solution de WPI native, le gel d'électrophorèse en conditions non-réductrices montre clairement la formation d'un dépôt en haut du gel de séparation et également la formation de bandes intenses correspondant aux monomères de β -Lg et d' α -La dans le gel de séparation. Toutefois, sur la Figure III.11., nous pouvons observer que les quantités relatives aux monomères d' α -La et de β -Lg sont très faibles après traitement thermique, ce qui indique que ces espèces ont été polymérisées sous la forme d'agrégats solubles et insolubles de masse moléculaire plus élevée pendant le traitement thermique. En effet, comme la Figure III.11. peut en témoigner, l'augmentation de la température du traitement thermique conduit à une pénétration plus lente des gros agrégats dans le gel de concentration, ce qui prouve bien que les tailles des agrégats sont plus importantes. On

remarquera également que l'intensité des bandes représentant les espèces monomériques d' α -La et de β -Lg diminue progressivement avec l'augmentation de la température du traitement thermique. De plus, nous avons déjà montré par diffusion statique de la lumière que quelques agrégats insolubles existaient même dans la solution de WPI natives et leur présence est confirmée dans le cadre de notre étude par l'intermédiaire de l'électrophorèse réalisée en conditions non-réductrices (Figure III.11.).

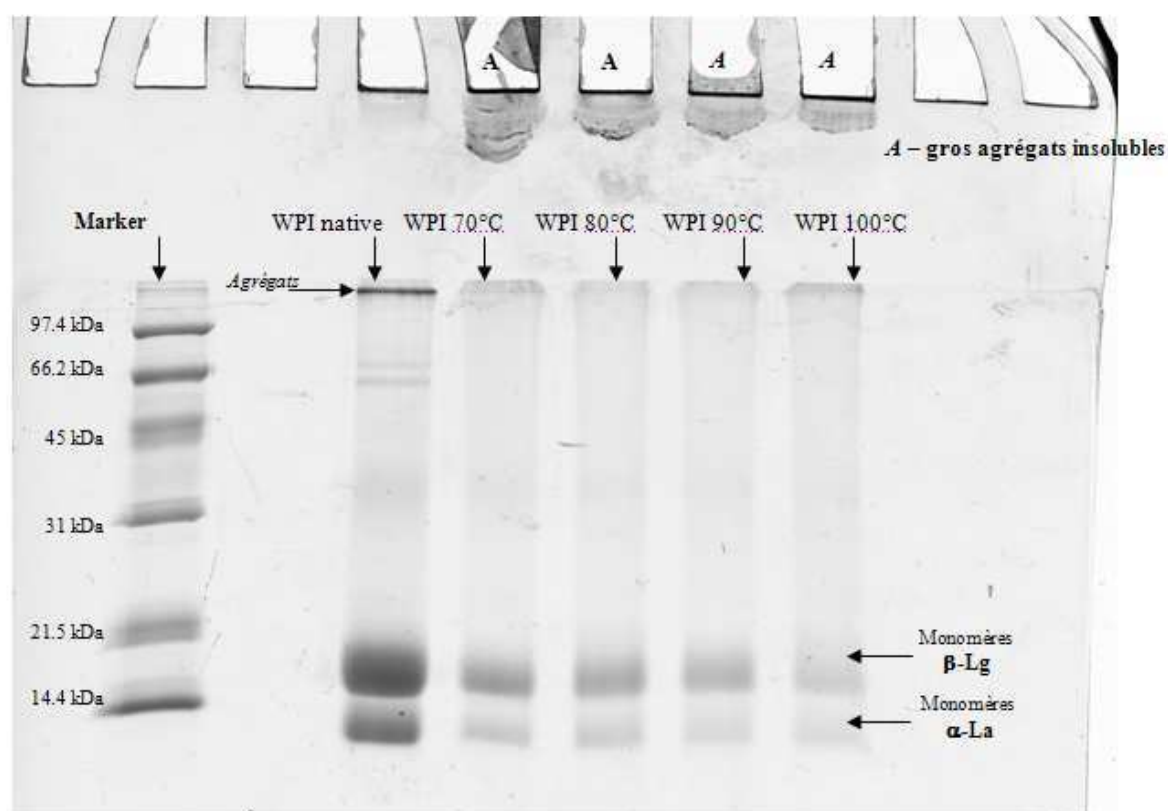


Fig. III.11. Electrophorèse en conditions non-réductrices des solutions de WPI natives et traitées thermiquement dans une gamme de température entre 70°C et 100°C.

Lorsque les échantillons de WPI ont été analysés par électrophorèse en présence de β -ME, les gros agrégats protéiques qui précédemment (en absence de β -ME) n'étaient pas en mesure de pénétrer dans le gel de concentration ont été dissociés (Figure III.12.). En même temps, des bandes relatives à la BSA, ainsi qu'aux monomères de β -Lg et d' α -La, aux dimères covalents de β -Lg et aux trimères covalents de β -Lg et de β -Lg/ α -La ont été observées. Nos résultats confirment donc que les ponts disulfures sont en très grande partie responsables de la formation

des agrégats insolubles et même de celle d'une bonne partie des agrégats solubles. Par conséquent, le fait que ces gros agrégats sont constitués par des ponts disulfures prouve qu'ils étaient essentiellement formés par l'agrégation des monomères non-natifs. Des résultats similaires concernant l'absence des agrégats solubles de taille intermédiaire lors du traitement thermique de la β -Lg ont été rapportés par *Renard (1994)*, alors que *Unterhaslberger et coll. (2007)* affirment que la faible proportion en agrégats solubles de masses moléculaires intermédiaires formés lors du chauffage de la β -Lg en présence de NaCl pourrait s'expliquer par leur agrégation rapide sous la forme d'agrégats plus gros.

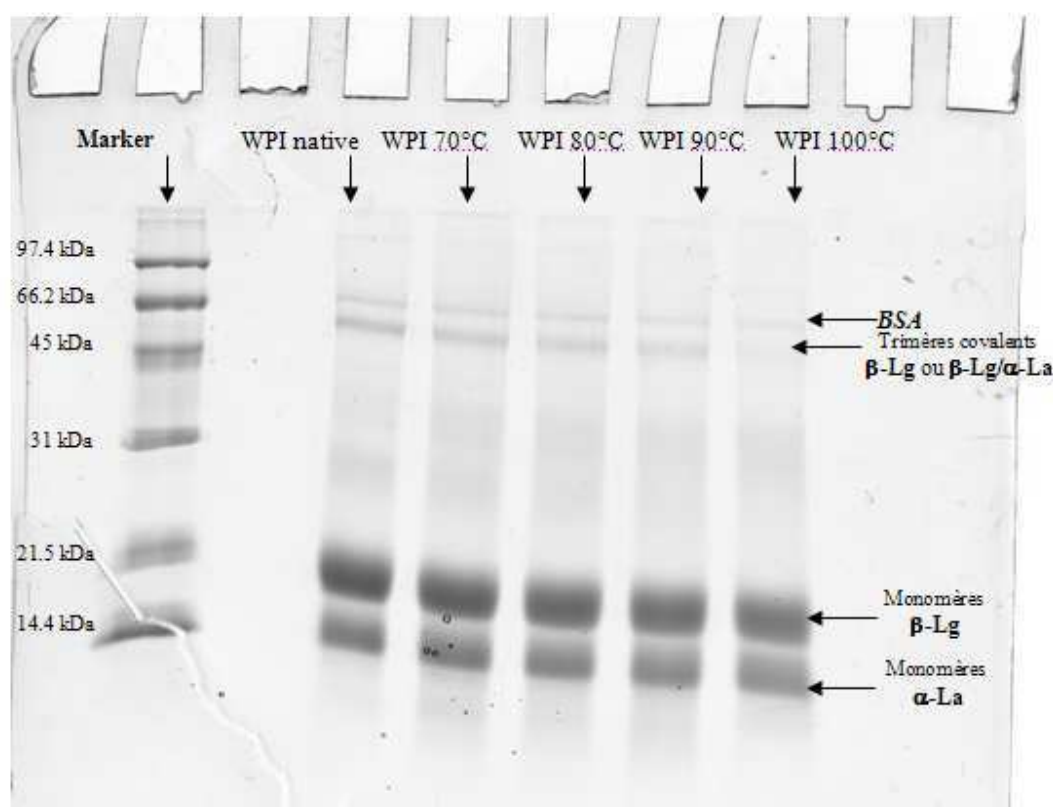


Fig. III.12. Electrophorèse en conditions réductrices (présence de β -ME) des solutions de WPI natives et traitées thermiquement dans une gamme de température entre 70°C et 100°C.

Enfin, les résultats observés par AFM et SDS – PAGE nous ont permis de montrer que l'application d'un traitement thermique en conditions dynamiques provoque des changements physico-chimiques significatifs dans la composition des solutions protéiques et entraîne la formation d'agrégats primaires associés principalement par des ponts disulfures. Il est probable

que les liaisons hydrophobes soient impliquées dans la réassociation des agrégats primaires sous forme de plus gros assemblages protéiques. Afin d'élucider l'influence de ces changements physico-chimiques induits par la chaleur sur les propriétés des WPI, leurs propriétés tensioactives et moussantes ont été étudiées et elles vont être présentées dans ce qui suit.

Tensiométrie

Afin de mieux comprendre le rôle des agrégats protéiques aux interfaces gaz-liquide, des mesures de tension superficielle (σ) ont été effectuées en fonction du temps sur des échantillons non-centrifugés de WPI (Figure III.13.). En effet, les protéines sont connues pour abaisser la tension de surface au cours de la formation d'un film interfacial. Ce phénomène résulte de la diffusion contrôlée des protéines vers les interfaces, de leur adsorption, ainsi que de leurs changements conformationnels qui ont lieu très lentement une fois qu'elles sont localisées à l'interface (*Krägel et coll., 1998*). En résumé, les protéines vont progressivement se concentrer à la surface d'une bulle où elles vont se déplier partiellement ; ensuite, des interactions peuvent s'établir entre elles par des liaisons intermoléculaires qui peuvent conduire à la formation d'un film cohésif qui stabilisera les bulles dans une mousse (*Adebawale & Lawal, 2003*). Ce mécanisme peut être considéré comme une dénaturation partielle des protéines.

La Figure III.13. met en évidence une forte différence entre la forme de la courbe de tension superficielle des solutions de WPI natives et celle des courbes des solutions traitées thermiquement. Concernant les solutions de protéines natives, une diminution continue de la tension de surface est observée. En revanche, lorsque le traitement thermique a été conduit respectivement à 70°C, 80°C et 100°C, les courbes $\sigma(t)$ sont confondues et elles présentent toutes une diminution rapide de σ suivie par un minimum local, puis par un maximum local qui précède une décroissance lente de $\sigma(t)$. Si au départ, la diminution de σ est plus rapide dans le cas des solutions de WPI traitées thermiquement, les valeurs de σ à long terme sont plus élevées que pour les protéines natives. La forme particulière des courbes résultant du traitement thermique est principalement due à la présence simultanée de protéines natives et dénaturées, ainsi que de protéines agrégées et non-agrégées. La brusque diminution des valeurs du σ à court terme pourrait tout d'abord être attribuée à la diffusion rapide des protéines dénaturées non-agrégées qui

sont plus hydrophobes et présentent donc une plus grande affinité pour l'interface air/eau que les protéines natives.

Ces résultats ont confirmé que certaines protéines sont déjà dénaturées après un traitement thermique à 70°C. Bien que leur quantité soit assez limitée, elle reste toutefois assez élevée pour modifier la cinétique d'adsorption sur des aires interfaciales faibles avec un gros excès de protéines, comme dans le cas des mesures de tension de surface avec des solutions à 2% w/v de WPI. Ces protéines dénaturées non-agrégées sont, par la suite, progressivement remplacées par des agrégats solubles qui présentent à la fois une faible diffusivité et une faible affinité pour l'interface air/eau, mais qui sont présents en très large excès. Pour le traitement à 70°C, une autre explication possible est de considérer une dénaturation partielle et réversible des protéines qui seraient suffisamment déstabilisées pour se comporter assez différemment des protéines natives à l'interface air/eau. La possibilité d'un fractionnement par rupture mécanique des plus gros agrégats dans le cas d'un traitement thermique à 70°C est également envisageable, ce qui est en accord entre les données de DSC et l'analyse de la taille des particules par granulométrie laser (Figure III.5.).

Sur la Figure III.13., seule la courbe $\sigma(t)$ obtenue pour la solution traitée thermiquement à 90°C a montré un comportement atypique : cette courbe présentait la même forme que pour les autres solutions traitées thermiquement, mais avec une valeur plus faible de σ . Une explication possible réside dans la présence d'une quantité élevée de gros agrégats insolubles formés à cette température de traitement, comme mentionné précédemment (Tableau III.2.), qui auraient sédimenté rapidement au cours de la mesure de tension de surface, ce qui aurait conduit à une solution non-homogène. Toutefois, des données supplémentaires sont encore nécessaires pour prouver cette affirmation. En conséquence, à cause de l'excès de protéines dans la solution par rapport à l'aire interfaciale disponible, la fraction de protéines solubles pourrait présenter un pouvoir tensioactif plus important parce qu'une bonne partie des agrégats moins tensioactifs serait devenue insoluble et aurait précipité, ce qui aurait eu pour conséquence que seules les espèces les plus tensioactives seraient restées en solution.

Toutefois, on retiendra que quelle que soit la température du traitement thermique, les données expérimentales ont montré que la présence des agrégats solubles augmente la valeur de σ à long terme par rapport aux protéines natives et elle devrait donc réduire la stabilité thermodynamique des interfaces gaz/liquide. La capacité foisonnante des solutions de WPI

traitées thermiquement devrait par conséquent diminuer lorsque la température du traitement thermique augmente, bien que la différence entre les valeurs de σ reste faible sur la gamme de température de traitement étudiée dans notre travail. Il faut cependant mentionner que dans la littérature, la relation entre la tension de surface et la stabilité réelle d'une mousse protéique (*ch. 3, sous-chapitre II.4.*) reste assez floue. Du point de vue théorique, la diminution de la tension de surface favorise la stabilité des interfaces pour des raisons purement thermodynamiques. Cependant, d'un point de vue pratique, par exemple pour une mousse soumise à des expériences de drainage, de nombreux travaux ont montré que la stabilité de la mousse et la rhéologie interfaciale sont fortement corrélées, mais que le lien avec la tension de surface est moins clair (*Miller et coll., 1998 ; Martin et coll., 2002 ; Davis & Foegeding, 2004 ; Rouimi et coll., 2005 ; Davis & Foegeding, 2007 ; etc.*). Cependant, il existe aussi dans la littérature des résultats opposés qui montrent un lien étroit entre les temps caractéristiques de drainage ou de disproportionnement des mousses protéiques et la tension de surface pour une adsorption à long terme (*Rodríguez Patino et coll., 2007*). Dans notre cas, une étude des propriétés des mousses est donc indispensable et elle sera développée dans le paragraphe suivant.

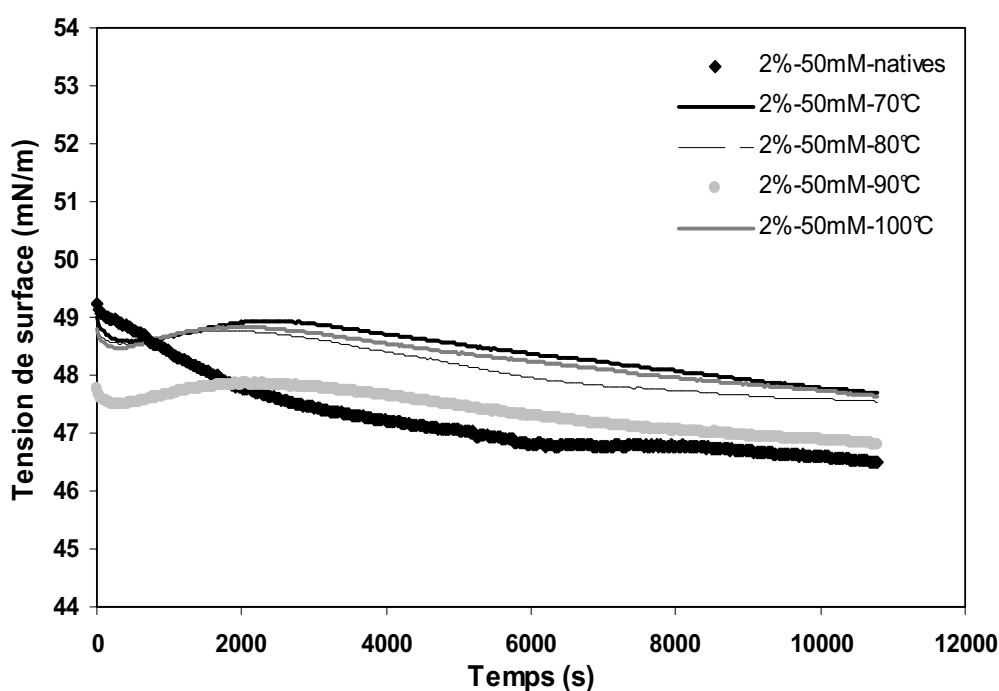


Fig. III.13. Evolution temporelle des mesures de tension de surface sur des solutions natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

Etude de la moussabilité : Foamskan

L'aptitude au foisonnement des solutions de WPI natives, ainsi que des solutions de WPI traitées thermiquement à 2% w/v, dans une gamme de températures comprises entre 70°C et 100°C a été étudiée par une technique de bullage. Le temps requis pour former un volume de mousse de 35 cm³ (ou temps de bullage), la densité, ainsi que la stabilité (exprimée par le temps de demi-vie) de la mousse ont été mesurés afin de caractériser les propriétés moussantes des solutions protéiques étudiées.

A partir de la Figure III.14. qui présente l'évolution de la formation de la mousse par bullage, nous avons constaté que les échantillons de WPI traités à des températures supérieures ou égales à 80°C présentent des propriétés moussantes très différentes de celles des solutions de WPI natives et/ou traitées thermiquement à 70°C. Tout d'abord, le temps de bullage nécessaire pour produire 35 mL de mousse (Tableau III.3.) a fortement augmenté lorsque la température du traitement thermique était supérieure ou égale à 80°C, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux présentés par *Zhu & Damodaran (1994)*. On notera également que le temps de bullage le plus élevé a été trouvé dans le cas de la solution de WPI chauffée à 90°C.

D'un point de vue purement cinétique, le plus frappant a été de s'apercevoir que la formation de la mousse, tant pour les solutions de WPI natives que pour les solutions de WPI dénaturées, n'a fait apparaître aucune différence significative avant 30 s de bullage, tandis que lorsque le temps de bullage a dépassé les 30 s, une rupture de pente a été observée lors du bullage dès que les échantillons de WPI ont été traités thermiquement au-delà de 80°C. Ce changement de pente peut s'expliquer par le fait que certaines de ces mousses ont commencé à se déstabiliser avant même la fin du bullage. Par ailleurs, nous pouvons affirmer que lorsque ce changement de pente se produit, le volume de liquide incorporé est à peu près le même pour toutes les mousses (Figure III.15.).

Le temps de bullage nécessaire pour atteindre le volume fixé de 35 cm³ de mousse a donc augmenté lorsque la température du traitement thermique était supérieure à 70°C (Tableau III.3.). Cependant, l'aptitude au foisonnement des solutions de protéines natives ou traitées thermiquement n'a fait apparaître aucune différence significative avant les 30 premières secondes de bullage, mais lorsque le temps de bullage a dépassé le seuil de 30 s, le processus de formation

de la mousse semble être ralenti par la présence des agrégats solubles et insolubles (Figure III.14). L'évolution de la mousse durant le bullage, et plus particulièrement la différence observée entre la pente des échantillons natifs et celles des échantillons traités thermiquement, pourraient donc être attribuées aux monomères de β -Lg et d' α -La qui jouent un rôle crucial au début de la formation de la mousse. Dans le cas des échantillons traités thermiquement, les monomères/dimères/trimères de β -Lg et d' α -La sont présents en proportions plus faibles que dans les échantillons de WPI natives (Figure III.11). Pour les solutions traitées thermiquement, les monomères/dimères/trimères de β -Lg et d' α -La font donc rapidement défaut, alors que les agrégats solubles et insolubles qui les ont remplacés sont moins aptes à former la mousse (Figure III.14.), ce qui est en accord avec les résultats précédents de tensiométrie. Un comportement particulier a été observé lors du bullage de la solution protéique chauffée à 90°C et ce comportement pourrait être attribué non seulement à la proportion, mais également à la taille des agrégats insolubles qui présentent eux aussi une valeur maximale à cette température. En accord avec mes résultats, *Unterhalsberger et coll. (2007)* ont rapporté que la présence des agrégats insolubles semble gêner la diffusion et par conséquent la formation de la mousse. Ces mêmes auteurs ont également affirmé que ce comportement pourrait s'expliquer par les propriétés spécifiques de ces agrégats, telles que leur taille, forme, régularité ou encore hydrophobicité de surface. Entre outre, *Rullier et coll. (2008)* ont montré que seule une proportion élevée d'agrégats solubles (environ 90%) serait capable de retarder la formation de la mousse, bien que leur étude concerne uniquement la β -Lg pure et les agrégats solubles d'une taille inférieure à 197 nm.

La capacité des protéines à incorporer du liquide dans la mousse a été mesurée par l'intermédiaire de la densité maximale de la mousse. Celle-ci constitue également une estimation généralisée de l'expansion qui peut potentiellement être atteinte lors de la production de la mousse par battage ou bien par un autre procédé de foisonnement puisqu'il existe une relation directe entre la densité de la mousse obtenue par bullage et le taux de foisonnement obtenu par battage (*German et coll., 1985*). La densité de la mousse dépend directement de la quantité de liquide incorporé dans la mousse durant le bullage.

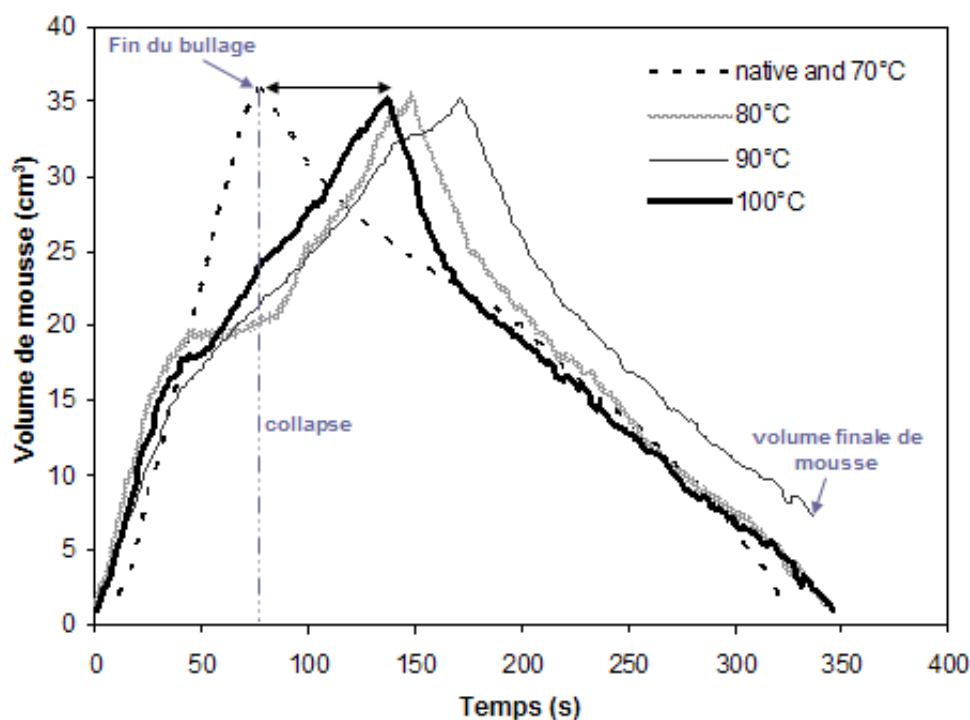


Fig. III.14. Etude du processus de foisonnement discontinu par bullage des solutions protéiques natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

Dans le cadre de notre étude, le Tableau III.3. confirme que les mousses produites à partir des protéines dénaturées sont plus denses que celles générées à base de WPI natives, mais qu'elles sont également plus instables, comme le montre le temps de demi-vie des mousses. On notera qu'après dénaturation des solutions protéiques, les mousses contiennent presque deux fois plus de liquide, comme le confirme la Figure III.15. qui représente le volume de liquide non incorporé dans la mousse et le Tableau III.3. Puisque la taille des bulles dans la mousse n'est pas significativement différente, ceci pourrait s'expliquer par la formation de films plus épais entre les bulles due à la présence des agrégats dans les films. En conséquence, les solutions de WPI natives et/ou chauffées à 70°C conduiraient à la formation de mousses sèches, alors que les solutions de WPI chauffées à des températures supérieures ou égales à 80°C conduiraient à la formation de mousses humides lorsqu'une technique de foisonnement par bullage est appliquée.

Tableau III.3. Caractérisation des mousses protéiques générées par bullage.

Echantillon	Temps de bullage (s)	Densité maximale	Temps de demi-vie (s)	Volume final de mousse* (%)	% fraction insoluble
native & 70°C	73	0,14	145	61	0,5
					2,0
80°C	157	0,22	78	35	6,3
90°C	180	0,18	77	40	10,0
100°C	145	0,2	76	37,8	4,3

* 100s après la fin du bullage

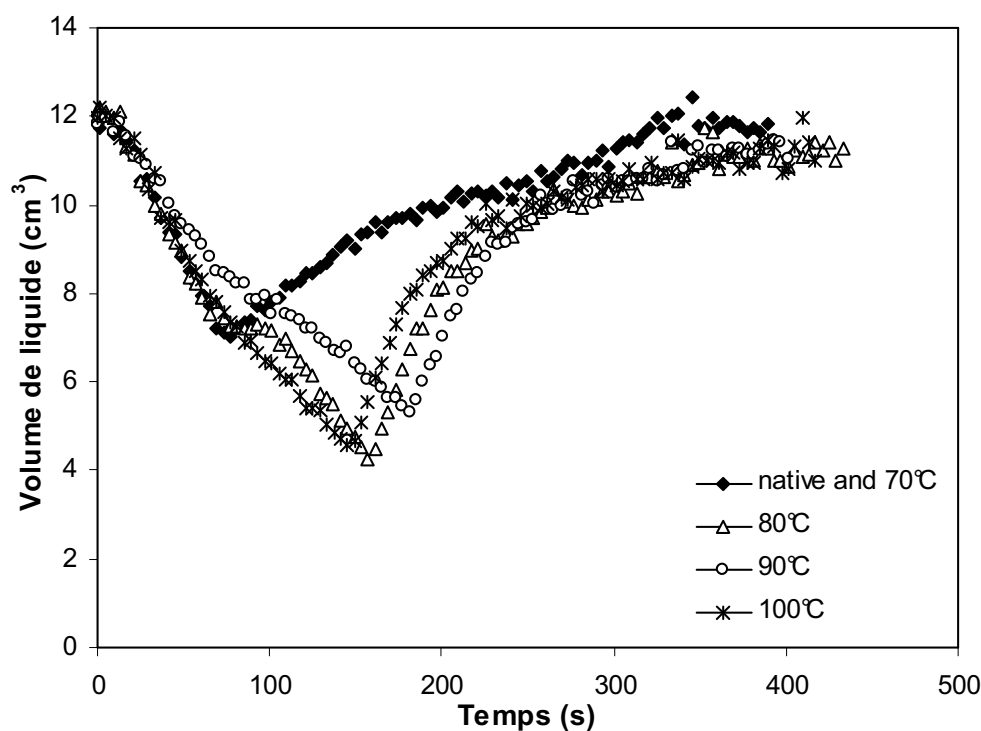


Fig. III.15. Evolution du volume de liquide non incorporé dans les mousses formées à partir des solutions protéiques natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

En résumé, la formation de la mousse s'est montrée très dépendante du traitement thermique appliqué aux solutions protéiques. Cet effet du traitement thermique a pu être distingué plus

facilement lorsque les mousses ont été produites par l'intermédiaire de la technique de bullage que lors du foisonnement par battage, comme nous le verrons plus loin. En effet, lorsqu'on compare les données issues du Tableau III.3. avec celles sur le pourcentage de protéines insolubles (Tableau III.2.), l'analyse montre que le temps de bullage est clairement corrélé au pourcentage de protéines insolubles et que c'est donc pour un traitement à 90°C qu'une augmentation significative de la proportion d'agrégats insolubles retarde le plus la formation de la mousse. Pour les autres paramètres quantitatifs, les tendances sont moins marquées à 80°C et 100°C, bien que le traitement à 90°C soit celui qui présente les courbes les plus éloignées de celles des protéines natives sur les Figures III.14 et III.15, ce qui est en accord avec les résultats présentés précédemment dans ce chapitre.

En ce qui concerne le processus de déstabilisation, la stabilité de la mousse a été estimée quantitativement par le volume de liquide drainé au cours du temps, ce qui peut être déduit à partir de la Figure III.15. Qualitativement, les différences significatives de comportement provoquées par l'application du traitement thermique sont présentées sur la Figure III.14. Par exemple, pour les échantillons de protéines natives, la déstabilisation de la mousse se déroule très lentement ; tandis que pour les solutions de WPI chauffées à des températures supérieures ou égales à 80°C, la déstabilisation se produit d'une façon brusque et violente (Figure III.14.). L'évolution des courbes lors de la déstabilisation est plus difficile à comparer puisque le taux de foisonnement diffère fortement en fonction des conditions de traitement lorsque le gaz est arrêté. Quantitativement, la stabilité a été estimée au moyen du temps de demi-vie des mousses en fonction du traitement thermique appliqué aux solutions protéiques (Tableau III.3.). Le temps de demi-vie confirme que la stabilité de la mousse a radicalement diminué lorsque les solutions de WPI ont été chauffées à des températures supérieures ou égales à 80°C, mais également qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les courbes décrivant la stabilité des échantillons à 80°C, 90°C et 100°C. Ce comportement s'expliquerait par la quantité de liquide incorporée dans la mousse : plus la quantité de liquide incorporée est importante, plus la mousse aura tendance à drainer rapidement. Nous montrerons plus loin que pour les mousses obtenues par battage, pour lesquelles le taux de foisonnement ne dépend que très peu du traitement thermique, une augmentation de la stabilité des mousses a été observée pour des solutions qui ont subi des traitements thermiques à 80°C et 90°C et formé ainsi des mousses sèches.

Conclusions

En conclusion, les résultats obtenus dans notre étude ont clairement indiqué que la dénaturation des protéines sériques devient significative pour un traitement thermique à une température de 80°C et que les solutions protéiques ont subi une dénaturation quasiment complète pour des traitements à 90°C et au delà. A partir des mesures de DLS et de SEC, nous avons également pu remarquer qu'au fur et à mesure que la température du traitement thermique est augmentée, celui-ci favorise la polymérisation des protéines, même à 70°C, sous la forme d'oligomères qui forment par la suite des agrégats solubles d'environ 160 nm de diamètre. Enfin, nous avons observé que l'augmentation de cette fraction est continue en fonction de la température pour les solutions traitées jusqu'à 100°C. En revanche, la quantité d'agrégats insolubles formés passe par un maximum lorsque la température du traitement thermique est de 90°C. Enfin, nous avons montré par SDS-PAGE que l'essentiel des agrégats solubles et insolubles sont stabilisés par des ponts disulfures et la microscopie nous a permis de constater que les agrégats insolubles sont denses, très irréguliers et fortement ramifiés.

D'un point de vue pratique, ces résultats expérimentaux sont extrêmement importants puisqu'ils nous ont permis de démontrer que les quantités respectives d'agrégats solubles et insolubles formés peuvent être contrôlées par la température appliquée lors du traitement thermique des solutions de WPI. Par exemple, lorsqu'un traitement thermique à des températures « douces » (entre 70°C et 90°C) est appliqué, la formation d'agrégats solubles qui ont ensuite tendance à s'agglomérer pour former des agrégats insolubles est favorisée. En revanche, lorsqu'une température « haute » de dénaturation (à 100°C, par exemple) est appliquée, un très grand nombre de petits agrégats sont formés simultanément, mais ensuite, ces agrégats sont assez stables, ce qui signifie que leur croissance et leur agglomération est restée limitée, ce qui a eu pour conséquence de réduire la proportion d'agrégats insolubles.

Plus généralement, ces résultats donnent accès à une meilleure compréhension du comportement des WPI face au phénomène d'agrégation suite à un traitement thermique dynamique et ils s'avèrent donc d'une grande importance pour l'industrie alimentaire en raison de l'application très vaste des WPI dans la fabrication des mousses alimentaires telles que les crèmes fouettées et glacées, ainsi que dans l'ensemble des desserts lactés. Il est donc maintenant

essentiel de mieux comprendre le rôle exact des agrégats sur la formation et la stabilisation de ces mousses, ainsi que de déterminer les conditions optimales d'agrégation des WPI pour ces processus.

En ce qui concerne les propriétés moussantes des protéines, les mécanismes permettant de former des mousses présentant des bulles très stables grâce à la présence des agrégats protéiques ne sont encore ni bien compris, ni bien décrits dans la littérature. En particulier, les questions restent nombreuses sur le rôle joué par les assemblages de type agrégats protéiques, notamment l'effet de leur teneur et leurs caractéristiques morphologiques. Kulozik (2008) a affirmé que les agrégats de protéines sériques pouvaient être utilisés pour améliorer la texture de certains produits tant que leur taille ne dépasse pas 20 μm , ceci afin d'éviter des sensations en bouche non désirées. En effet, un goût sableux ou granuleux en bouche pourrait remplacer la sensation de moelleux et/ou d'onctuosité recherchée par le consommateur chez les produits de type mousse. En ce qui concerne la taille optimale, il semblerait que la taille des agrégats doive être comprise entre 30 nm et 250 nm afin d'éviter un drainage immédiat des mousses, ce qui limiterait notre intérêt aux agrégats solubles. De plus, à cause de la nature peu déformable et peu élastique des agrégats et de la fragilité des mousses, la présence d'agrégats trop gros, non-uniformes et trop ramifiés pourrait causer la déstabilisation des mousses en perçant le film interfacial. Un autre aspect du problème réside dans le positionnement des agrégats par rapport au film interfacial au sein de la mousse :

- Lorsqu'une quantité assez importante d'agrégats protéiques présente une taille très inférieure au micromètre avec une distribution des tailles uniforme, ceux-ci peuvent former des couches minces cohésives qui peuvent prévenir la rupture du film interfacial ;
- Les agrégats plus gros sont susceptibles de s'insérer au milieu d'autres agents de surface protéiques et d'établir des pontages entre deux interfaces, ceci constituant une autre possibilité d'amélioration de la stabilité des mousses.

Les données obtenues précédemment en tensiométrie et par une technique de bullage ne permettent pas pour l'instant de confirmer ces interprétations issues de la littérature dans le cas des WPI. Si le rôle néfaste des agrégats insolubles sur la formation d'une mousse a été mis en évidence par nos expériences, il n'est pas encore possible de déterminer avec précision quels sont les rôles respectifs de leur taille et de leur morphologie sur ce résultat. De même, le rôle positif des agrégats solubles sur la stabilité des mousses n'a été confirmé, ni par la tensiométrie,

ni par le FoamScan. Ainsi, aucune corrélation n'a pu être établie entre d'une part la proportion d'agrégats solubles, leur taille et leur forme, et d'autre part les paramètres mesurés lors des essais de bullage (temps de bullage, densité maximale, temps de demi-vie...).

Afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle des agrégats protéiques de WPI sur la formation et la stabilisation des mousses laitières, nous allons maintenant nous intéresser plus en détail à la production de mousses protéiques par battage afin de voir s'il est possible de mieux relier les connaissances acquises sur la formation des agrégats protéiques à leurs propriétés moussantes, voire même d'optimiser la fonctionnalisation de ces agrégats dans le but d'améliorer les propriétés des mousses, telles que la stabilité dans le temps, la texture, éventuellement les taux de foisonnement accessibles.

II. CARACTERISATION DES MOUSSES PROTEIQUES OBTENUES EN BATCH

L'objectif de cette partie de notre étude est principalement de comprendre le rôle joué par la formulation et les différents ingrédients qu'elle contient, notamment les assemblages protéiques, lors de l'aération en batch des solutions de WPI. Les propriétés physico-chimiques des mousses telles que le taux de foisonnement, la stabilité contre le drainage, la texture et la microstructure ont été étudiées en détail.

II.1. DETERMINATION DU TEMPS OPTIMAL DE BATTAGE D'UNE SOLUTION DE WPI

La durée de battage est liée à l'affinité des protéines pour les interfaces eau/air et à leur capacité à diffuser et à s'adsorber aux interfaces. Le taux de foisonnement dépend du temps de battage. *Lau & Dickinson, (2004)* ont démontré qu'après 10 minutes de battage, le taux de foisonnement atteint un plateau, et qu'à partir de ce moment, l'incorporation du gaz devient très faible. En général, des temps de battage relativement longs permettent un déplissement plus prononcé des protéines de blanc d'œuf, ce qui conduit à des interactions des éléments protéiques plus élevées à l'interface d'une bulle et donc à un film interfacial plus élastique. Toutefois, un temps de battage trop prolongé peut conduire au surbattage du blanc d'œuf; celui-ci se produit lorsque les protéines coagulent trop fortement à l'interface en formant des agrégats insolubles, ce qui peut perturber de manière significative la structure de la mousse. Cela peut conduire, par exemple, à une mousse beaucoup moins stable, ainsi qu'au final, à une diminution du taux de foisonnement (*Lau & Dickinson, 2004*).

Afin de déterminer la durée optimale de battage et surtout dans le but d'éviter le phénomène de surbattage, une étude s'intéressant spécifiquement à la formation de la mousse en batteur a été effectuée. Le battage a été conduit à niveau 10 sur le batteur KitchenAid (soit 256 trs/min.) pendant une durée de 15 min., avec des prélèvements tous les 2 min. 30 s pour une mousse formée à partir d'une solution à 1% w/v de WPI (Cf. section « *Matériels et Méthodes* »). Des mesures de taux de foisonnement et de stabilité contre le drainage ont été réalisées, ainsi qu'une analyse des clichés des mousses, afin de caractériser les échantillons de mousse prélevés.

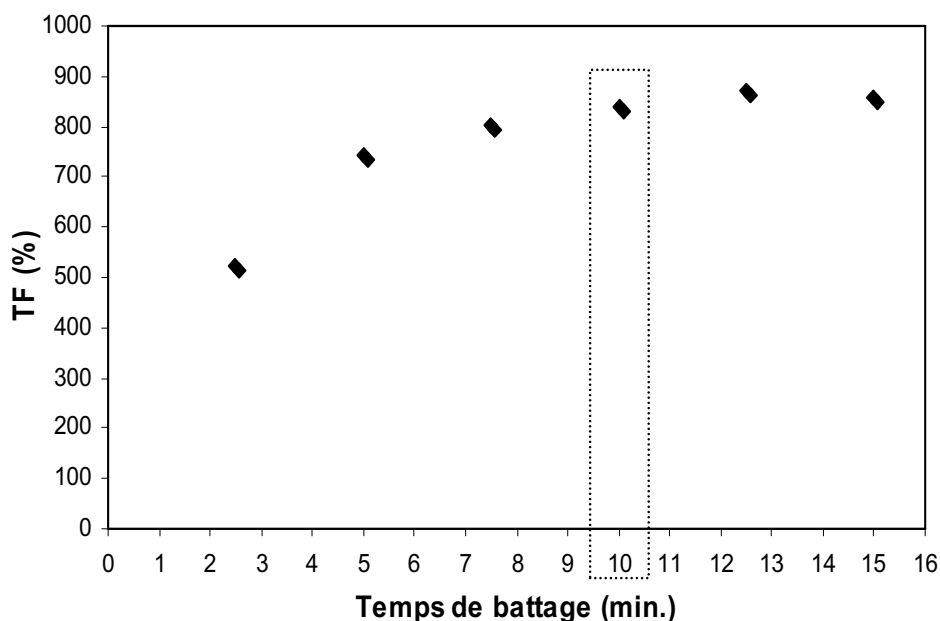


Fig. III.16. Evolution du taux de foisonnement (TF) en fonction du temps de battage.

Sur la Figure III.16., on observe que la valeur du taux de foisonnement qui correspond à une durée d'agitation de 10 min. est de 840%. Si l'on poursuit le battage pendant encore 2 min. 30 s, la mousse continue d'incorporer du gaz, mais après une durée de battage de 12 min. 30 s, on atteint un seuil et le taux de foisonnement de la mousse se stabilise, voire commence à diminuer légèrement. Cela pourrait correspondre au fait que le phénomène de surbattage débute pour notre formulation après un temps de battage supérieur à 12 min. 30 s.

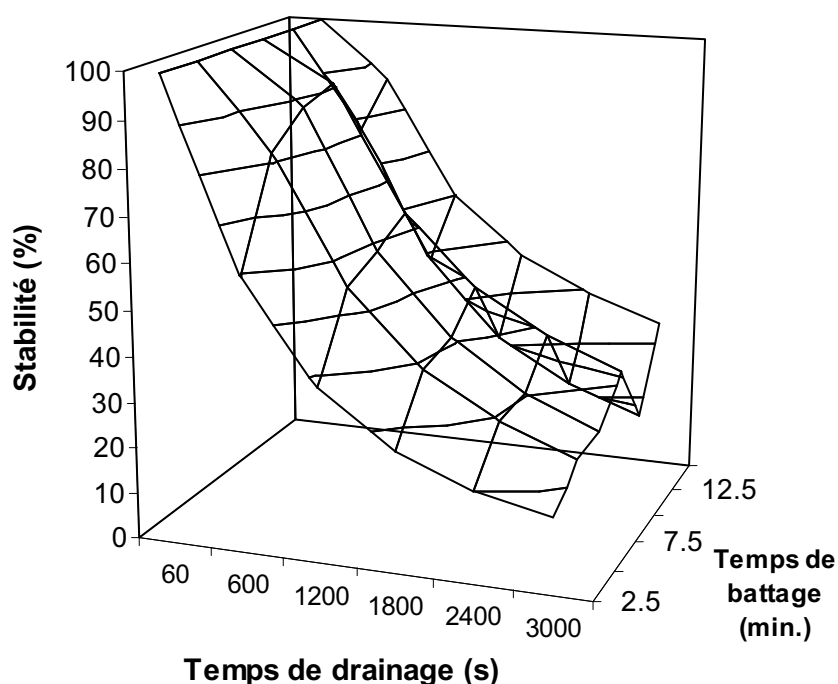


Fig. III.17. Evolution de la stabilité en fonction de la durée de battage (mousse à 1% w/v).

Tableau III.4. Paramètres caractéristiques de l'évolution du drainage.

Temps de battage (min.)	TF (%)	t 1^{ère} goutte(s)	Stabilité à la fin du drainage (%)
2,5	524	110	12,2
5	744	310	18,8
7,5	805	390	20,0
10	841	440	28,7
12,5	871	310	13,5
15	860	360	28,8

L'évolution de la stabilité de la mousse en fonction de la durée de battage est présentée sur la Figure III.17., ainsi que dans le Tableau III.4. Nous avons pu observer que pour une durée de battage de 10 min., on observe la cinétique de drainage la plus lente puisque la première goutte n'est observée qu'au bout de 440 s ; de plus, à la fin du cycle de drainage, la stabilité est encore de 28%. En revanche, dans le cas d'une durée de battage de 15 min., la stabilité avoisine encore 28% à la fin du cycle de drainage, mais la première goutte draine plus rapidement, au bout de 360 s. En conclusion, en ce qui concerne la stabilité contre le drainage, nos résultats laissent présager

qu'il existe une durée optimale de battage qui résulte d'un compromis entre le taux de foisonnement atteint et la stabilité de la mousse et qui se situe entre 10 et 12 min. de battage.

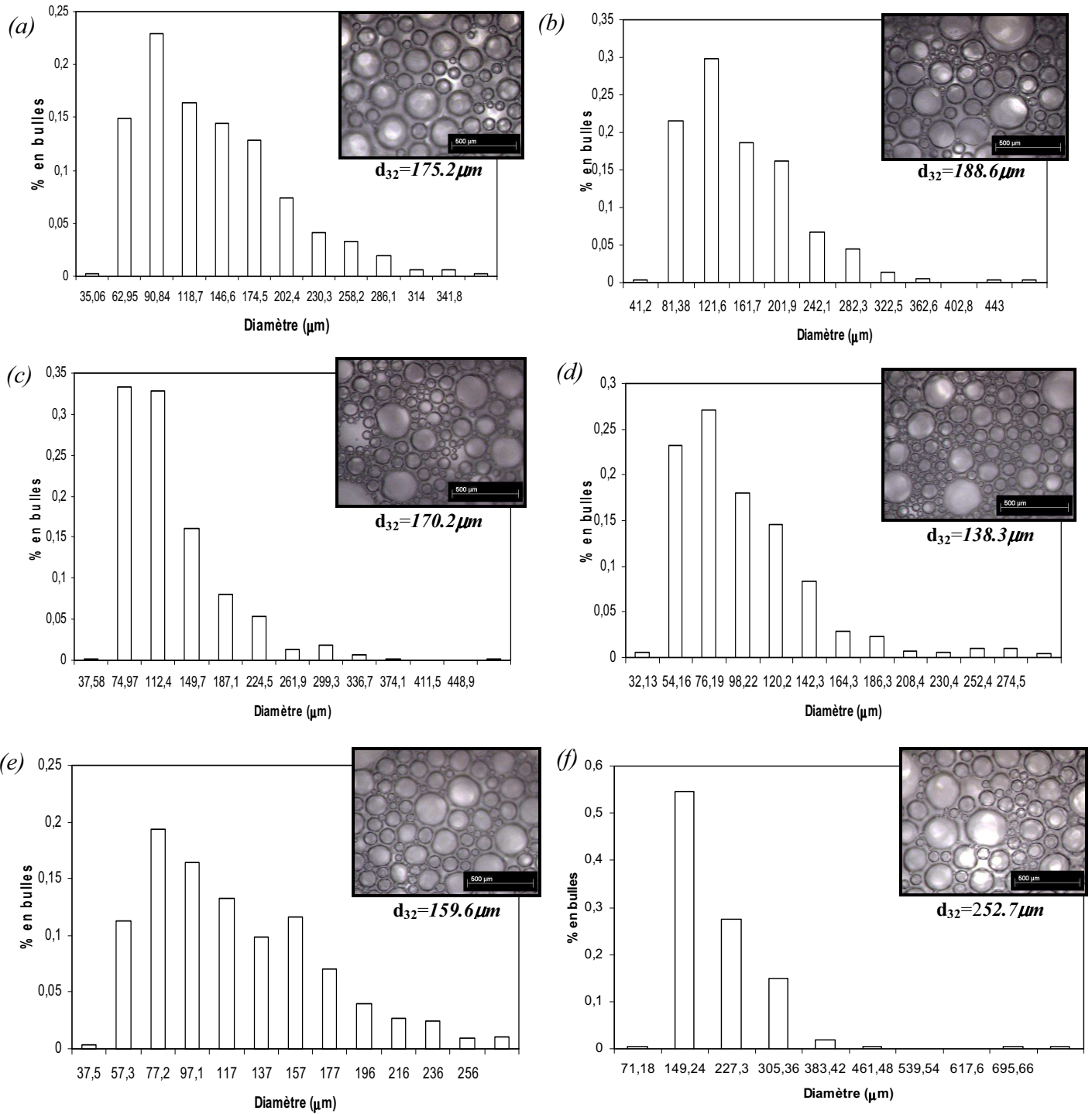


Fig. III.18. Histogrammes représentant la distribution de taille des bulles dans la mousse après un battage de (a) 2 min. 30 s, (b) 5 min., (c) 7 min. 30 s, (d) 10 min., (e) 12 min. 30 s, (f) 15 min.

Les images des bulles dans les mousses, ainsi que leurs histogrammes sont présentées sur la Figure III.18. ; celle-ci montre de manière détaillée l'évolution de la taille des bulles dans la mousse (à 1% w/v WPI) durant le battage.

A partir de l'analyse des valeurs du diamètre moyen (d_{32}) et des images des bulles dans les mousses, nous avons remarqué que pour des durées de battage de 2,5, 5 et 7,5 min., la taille des bulles reste proche de 175 μm , alors que pour un temps de battage de 10 min., le diamètre moyen passe par un minimum ($d_{32} = 138 \mu\text{m}$) avant d'augmenter à nouveau jusqu'à atteindre un diamètre moyen (d_{32}) égal à 253 μm dans le cas d'une durée de battage de 15 min. Dans la mousse obtenue pour un temps de battage de 10 min., la classe la plus représentée des bulles (28% du total) se situe autour d'un diamètre de 76 μm (Figure III.18.d).

A partir de la Figure III.16. et de la Figure III.18., nous avons pu conclure que pour une durée de battage comprise entre 5 et 7 min. 30s, l'incorporation rapide de l'air est favorisée, ce qui est prouvé par l'augmentation continue du taux de foisonnement (Figure III.16.), alors que le diamètre moyen des bulles se maintient aux alentours de 180 μm . Lorsque la durée de battage se situe entre 10 min. et 12 min. 30s, un plateau est atteint et l'incorporation de l'air dans la formulation est stoppé. Alors, une deuxième étape commence, en l'occurrence la formation des petites bulles par déformation et rupture des plus grosses, ce qui conduit à un d_{32} plus faible. En revanche, l'évolution de la stabilité de la mousse obtenue par battage après 12 min. 30s fait apparaître une chute significative. De plus, l'apparition du phénomène de surbattage est confirmée par l'analyse des caractéristiques de la mousse formée pour une durée de battage de 15 min. puisque l'évolution du taux de foisonnement montre une légère diminution qui fait suite au phénomène de coalescence des bulles, puisqu'un diamètre moyen voisin de 225 μm a été mesuré.

Afin de comparer le comportement des protéines natives et traitées thermiquement lors de la formation de la mousse au cours d'une durée de battage de 10 minutes, nous présentons sur la Figure III.19. l'évolution du taux de foisonnement des mousses de protéines natives et celle des mousses de protéines dénaturées par un traitement thermique à 100°C. Nous avons pu constater que la capacité foisonnante des protéines natives est supérieure à celle des protéines dénaturées seulement lorsque le temps de battage est de 6 minutes, alors que l'inverse prévaut, notamment pour des temps de battage entre 6 et 9 minutes. On notera enfin que lorsque le phénomène de surbattage commence à se manifester, au bout de 10 minutes de battage, les deux types de

protéines, natives et dénaturées, présentent une capacité foisonnante égale et semblent affectées simultanément.

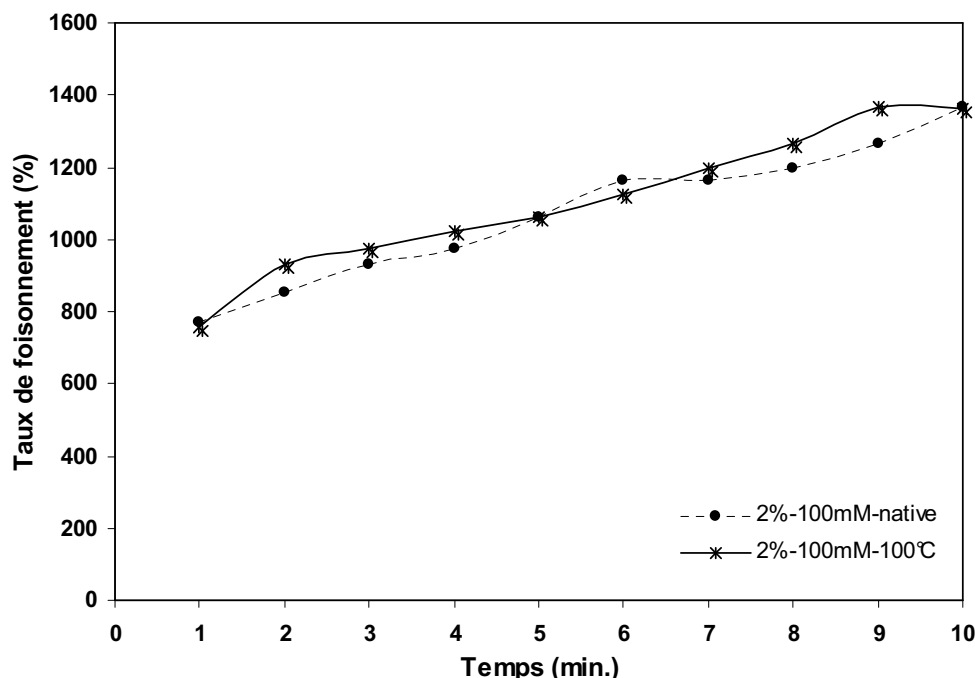


Fig. III.19. Evolution du taux de foisonnement en fonction de la durée de battage.

En conclusion, ce travail nous a permis de trouver une durée optimale de battage de 10 min. afin d'éviter le phénomène de surbattage et par conséquent la destruction de la mousse et elle sera retenue pour la suite de notre étude expérimentale.

II.2. EFFETS DES INGREDIENTS ET DE LEURS INTERACTIONS SUR LES CARACTERISTIQUES DES MOUSSES D'ISOLAT DE PROTEINES SERIQUES

L'effet de certains facteurs sur les caractéristiques des mousses a été étudié par une approche de type « plan d'expériences » décrite précédemment dans la *section Matériels et Méthodes* (sous-chapitre II.3.5.). Les résultats illustrant les effets respectifs de la concentration en protéines, de la force ionique et de la teneur en sucre sur le taux de foisonnement, la texture (représentée par le module conservatif G') et la stabilité des mousses sont présentés sur la Figure III.20. L'analyse statistique des résultats issus d'un plan d'expériences a montré que comme on pouvait s'y attendre, la concentration en protéines et la force ionique améliorent fortement le taux de

foisonnement, alors que la présence de sucre l'influence négativement, c'est-à-dire le diminue. Les résultats expérimentaux ont confirmé l'impact positif de la concentration en WPI et de la force ionique sur la stabilité et la texture de la mousse et dans une moindre mesure l'effet positif du sucre, puisque seulement une amélioration sensible de la stabilité et du module élastique (G') a pu être observée. L'augmentation de la concentration en WPI (de 2 à 4%) ou de la force ionique (de 0 à 100 mM), semble cependant avoir un effet prépondérant sur la stabilité contre le drainage des mousses et bien moindre sur le taux de foisonnement et la texture.

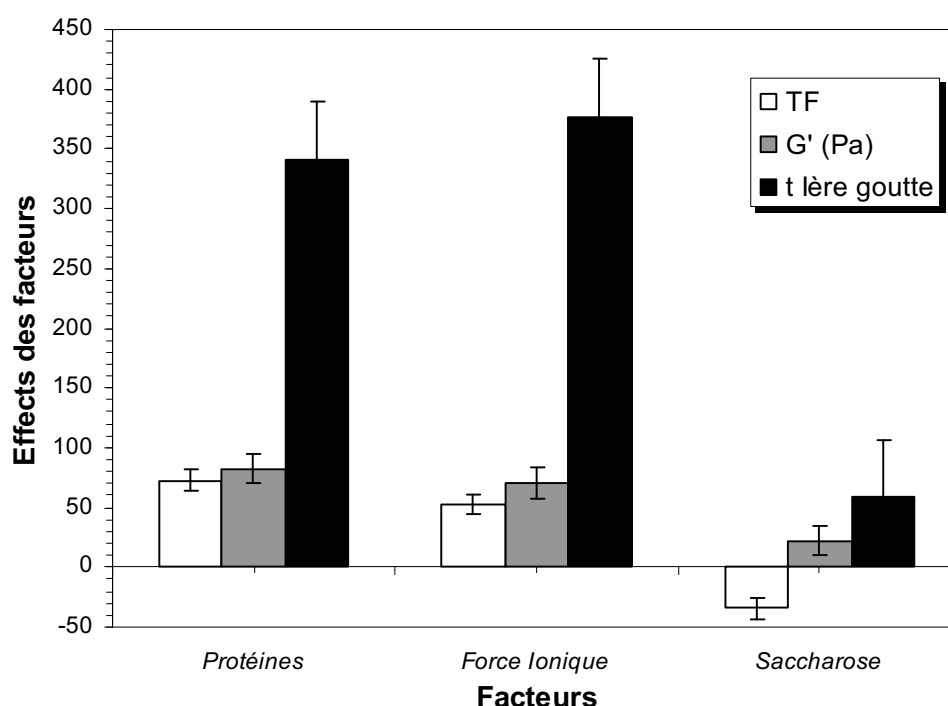


Fig. III.20. Représentation des effets des facteurs sur les principaux caractéristiques des mousses.

Le Tableau III.5. résume les effets de la concentration en protéines, de la force ionique, de la teneur en sucre, ainsi que les effets des interactions de premier ordre entre ces facteurs sur les caractéristiques physico-chimiques des mousses. Le signe de ces effets (exprimé par le sens des flèches), ainsi que leurs niveaux de signification sont également précisés :

- le symbole *** signifie que la variable contrôlée ou le prédicteur présente une probabilité d'avoir un effet significatif sur la réponse supérieure à 99% ;
- le symbole ** indique une probabilité d'avoir un effet significatif supérieure à 95% ;

- le symbole * dénote une probabilité d'un effet significatif supérieure à 90%.

Lorsqu'il n'y a ni flèche, ni symbole, l'effet est considéré comme non significatif d'un point de vue statistique. Par exemple, concernant l'effet de la force ionique sur le module conservatif (G') des mousses (Tableau III.5), $\uparrow(***)$ signifie que l'augmentation de la force ionique a plus de 99% de chance d'entraîner une augmentation du module G' des mousses. A partir du tableau III.5., nous avons pu observer que l'interaction « protéines×sucre » joue un rôle négatif sur le taux de foisonnement et que l'interaction « force ionique×sucre » influence d'une manière négative à la fois le taux de foisonnement et la stabilité des mousses.

Tableau III.5. Significativité des effets et de leurs interactions sur les propriétés des mousses.

Réponses →	TF	G'	η	t 1 ^{ère} goutte	$t_{1/2}$	d_{32}
Variables ↓	(%)	(Pa)	(Pa.s)	(min.)	(min.)	(μm)
Protéines (A)	$\uparrow(***)$	$\uparrow(***)$	$\uparrow(**)$	$\uparrow(***)$	$\uparrow(***)$	
Force ionique (B)	$\uparrow(***)$	$\uparrow(***)$		$\uparrow(***)$	$\uparrow(***)$	
Sucre (C)	$\downarrow(***)$	$\uparrow(*)$	$\uparrow(***)$		$\uparrow(**)$	
Protéines*Force ionique (AB)	$\uparrow(***)$					
Protéines*Sacre (AC)	$\downarrow(***)$					$\downarrow(*)$
Force ionique*Sacre (BC)	$\downarrow(**)$			$\downarrow(***)$	$\downarrow(***)$	
	✦	✦	✦	✦	✦	✦
	✧	✧		✧		

✦ indique qu'il n'existe pas de corrélation entre les résidus (test de Durbin-Watson > 1,4)

✧ indique que $R^2 \geq 80\%$

Dans le cadre de notre étude statistique, une analyse de type « comparaisons multiples » a été également employée afin de distinguer les groupes statistiquement homogènes des groupes hétérogènes dans les données. Le Tableau III.6. résume les résultats de l'analyse de type « comparaisons multiples » ; les groupes notés avec le même symbole sont homogènes entre eux, mais significativement différents des autres groupes. Nous avons trouvé qu'à 4% w/v de WPI, la force ionique n'améliore plus le taux de foisonnement. Une information qui s'avère intéressante est le fait qu'une formulation à 4%-10% de sucre et une formulation à 2%WPI-100 mM-

10% sucre présentent toutes deux la même capacité foisonnante. En effet, il semblerait que la force ionique de 100 mM NaCl dans la deuxième formulation puisse compenser le fait qu'elle contienne 2% de WPI en moins. De même, il est également intéressant de noter qu'une formulation à 2% WPI-100 mM présente la même stabilité contre le drainage qu'une formulation à 4% WPI-10% sucre, ce qui confirme le rôle bénéfique de la force ionique sur la stabilité des mousses de protéines sériques.

Tableau III.6. Représentations des groupes homogènes par « comparaisons multiples ».

Type mousse	TF (%)	G' (Pa)	$t\ 1^{ère}\ goutte$ (min.)	$t_{1/2}$ (min.)
2%				
4%	▲	✱		★
2%-100 mM			✱	✱
4%-100 mM	▲		✱	
2%-10% Sucre				★
4%-10% Sucre	☆	✱	✱	
2%-100 mM-10% Sucre	☆			✱
4%-100 mM-10% Sucre			✱	
3%-50 mM-5% Sucre			✱	

II.3. EFFET COUPLE « FORCE IONIQUE–TEMPERATURE DE DENATURATION »

Dans le cadre de nos travaux, nous avons étudié les effets du traitement thermique dynamique et de la force ionique sur les propriétés des mousses de WPI, telles que le taux de foisonnement, la taille des bulles, la stabilité contre le drainage et la texture. Cette partie de notre étude a été conduite sur une solution de 2% w/v WPI à des différentes concentrations en sel (0 mM, 50 mM et 100 mM NaCl) et à pH 7, solution ayant subi un traitement thermique à 100°C dans un échangeur tubulaire. Le traitement thermique des protéines globulaires, telles que la β -lactoglobuline, constitue une voie intéressante afin d'améliorer leurs propriétés fonctionnelles, particulièrement la texture et la stabilité des aliments présentant une structure de mousse. Les

résultats expérimentaux présentés dans cette étude ont mis en évidence un effet significatif de la force ionique sur les propriétés des mousses à travers la proportion d'agrégats solubles/insolubles formés durant le traitement thermique. Nous allons maintenant les détailler.

Capacité foisonnante

L'aptitude au foisonnement des solutions de protéines natives et dénaturées en l'absence ou en présence de NaCl a été vérifiée. Nos résultats, illustrés par la Figure III.21., montrent tout d'abord le rôle positif du NaCl sur le taux de foisonnement, indépendamment du traitement thermique. Ce comportement semble en accord avec les données de la littérature (Raikos, Campbell, & Euston 2007), puisque la présence de sel augmente généralement la quantité de protéines adsorbées étant donné que les répulsions électrostatiques entre protéines à l'interface sont réduites.

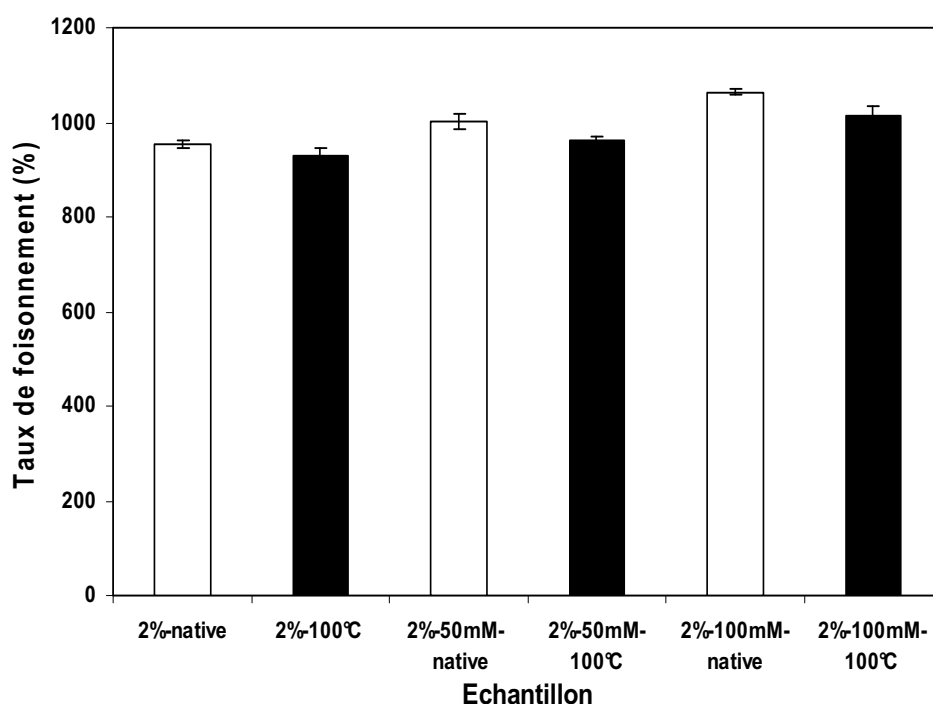


Fig. III.21. Evolution du taux de foisonnement dans les mousses de protéines sériques.

La Figure III.21. démontre également que les mousses produites à partir de solutions dénaturées (avec ou bien sans sel) ne présentent aucune amélioration significative de leur capacité foisonnante et que la dénaturation des protéines induit même une légère diminution de cette capacité. En revanche, les analyses statistiques réalisées sur les échantillons étudiés ont

montré une augmentation significative du taux de foisonnement pour les mousses obtenues à partir de protéines natives en présence de NaCl. De plus, les tendances observées dans le cadre de notre étude se révèlent en accord avec la littérature (Davis & Foegeding, 2004). Bals & Kulozik (2003) ont affirmé qu'à des niveaux de dénaturation supérieurs à 50%, l'agrégation des protéines est trop avancée, c'est-à-dire que la plupart des groupements réactifs, principalement les ponts disulfures, ont déjà réagi les uns avec les autres dans la solution protéique. Par conséquent, il y a moins de molécules disponibles pour interagir afin de constituer les films interfaciaux au cours de la formation de la mousse. De même, Grinberg et coll. (1993) ont également constaté que dans le cas de l'ovalbumine, la principale protéine du blanc d'oeuf, la capacité foisonnante était réduite lorsque le degré de dénaturation était supérieur à 60%, tandis que Zhu & Damodaran (1994) ont signalé des résultats similaires pour les WPI lorsque le niveau de dénaturation était supérieur à 40%. De plus, Bals & Kulozik (2003) ont prétendu que l'incorporation d'air sous forme de bulles de très faibles diamètres dans les mousses pourrait également être gênée par l'augmentation de la viscosité de la phase continue due à la dénaturation. Dans notre étude, la diminution du taux de foisonnement a été observée même pour des niveaux de dénaturation assez faibles (seulement 10% de dénaturation à force ionique élevée), et par conséquent, cette diminution du taux de foisonnement ne peut pas être attribuée à un changement de viscosité des solutions protéiques suite au traitement thermique.

Finalement, nos résultats confirment aussi que le taux de foisonnement des mousses ne dépend que très peu du traitement thermique puisque les différences entre les mousses produites à partir de solutions de protéines natives et dénaturées ne présentent que des écarts assez limités, même si le traitement thermique entraîne une légère diminution. Zhu & Damodaran (1994) ont montré que ce sont les protéines solubles non-agrégées qui contribuent à la formation de la mousse et qu'elles commencent à faire défaut après traitement thermique, ce qui pourrait expliquer la légère diminution de l'aptitude au foisonnement observée dans notre travail après traitement thermique.

Distribution de taille des bulles

L'analyse d'images a mis en évidence des différences significatives entre la microstructure des mousses préparées à partir des solutions de protéines natives et celles formées à partir des

solutions de protéines sériques qui ont fait l'objet d'un traitement thermique. L'influence de la force ionique et celle du traitement thermique sur la distribution de tailles des bulles et sur la taille moyenne des bulles dans les mousses sont illustrées qualitativement par la Figure III.22. et quantitativement par la Figure III.23. Puisque l'on peut considérer que la viscosité de la solution protéique n'a pas été affectée de manière significative ni par l'ajout de NaCl a été ajouté, ni par l'application du traitement thermique, l'évolution des tailles de bulles est gouvernée uniquement par les interactions entre les protéines, telles que l'aggrégation thermique et les répulsions électrostatiques. La Figure III.22. montre que la morphologie des bulles, ainsi que leur polydispersité dépendent fortement de la présence du NaCl et du traitement thermique, avec une variabilité un peu plus importante résultant du traitement thermique. Les résultats expérimentaux révèlent que l'addition de NaCl a augmenté le diamètre de Sauter, alors que l'application du traitement thermique a conduit à une diminution significative de d_{32} . De plus, il semblerait que le sel accroisse l'effet du traitement thermique : ainsi, le traitement thermique des solutions de WPI natives avec 50 mM et 100 mM NaCl conduit à une diminution du diamètre moyen des bulles d'environ 20 μm de plus que pour les mousses générées à partir de solutions de WPI natives (Figure III.22.). Toutefois, on notera que les gains obtenus par une augmentation de 50 mM à 100 mM de NaCl sont limités.

Ces tendances sont accompagnées par un changement de la distribution de taille des bulles des mousses. En effet, sur la Figure III.22.a., la distribution des tailles de bulles se révèle très hétérogène, avec de toutes petites bulles dispersées parmi de plus grosses. L'ajout du NaCl rend la distribution de taille des bulles bien plus homogène (Figure III.22.c.), alors que la non-uniformité de la distribution semble être amplifiée par l'application du traitement thermique (voir la Figure III.22.d. par rapport à la Figure III.22.a., et la Figure III.22.f. par rapport à la Figure III.22.c.). Ces affirmations qualitatives ont été confirmées quantitativement par l'analyse des distributions de tailles des bulles en s'appuyant sur la mesure du diamètre équivalent en surface représenté en distribution cumulée (Figure III.23.).

En pratique, l'effet majeur de NaCl sur la taille des bulles consiste à déplacer la distribution des tailles vers les diamètres plus élevés, ce qui se traduit par de plus grandes valeurs de d_{32} , indépendamment du traitement thermique ; ceci résulte principalement de la disparition des bulles les plus petites. La conséquence est que l'ajout de NaCl conduit à une distribution plus uniforme des tailles de bulles. En revanche, l'effet majeur du traitement thermique consiste à

déplacer la distribution des tailles vers les diamètres plus faibles. Cela pourrait être attribué à la présence d'agrégats solubles qui présentent de fortes propriétés foisonnantes. L'effet combiné de l'ajout de NaCl et du traitement thermique est représenté sur la Figure III.22.f : on observe des bulles à la fois plus petites et de taille plus uniforme.

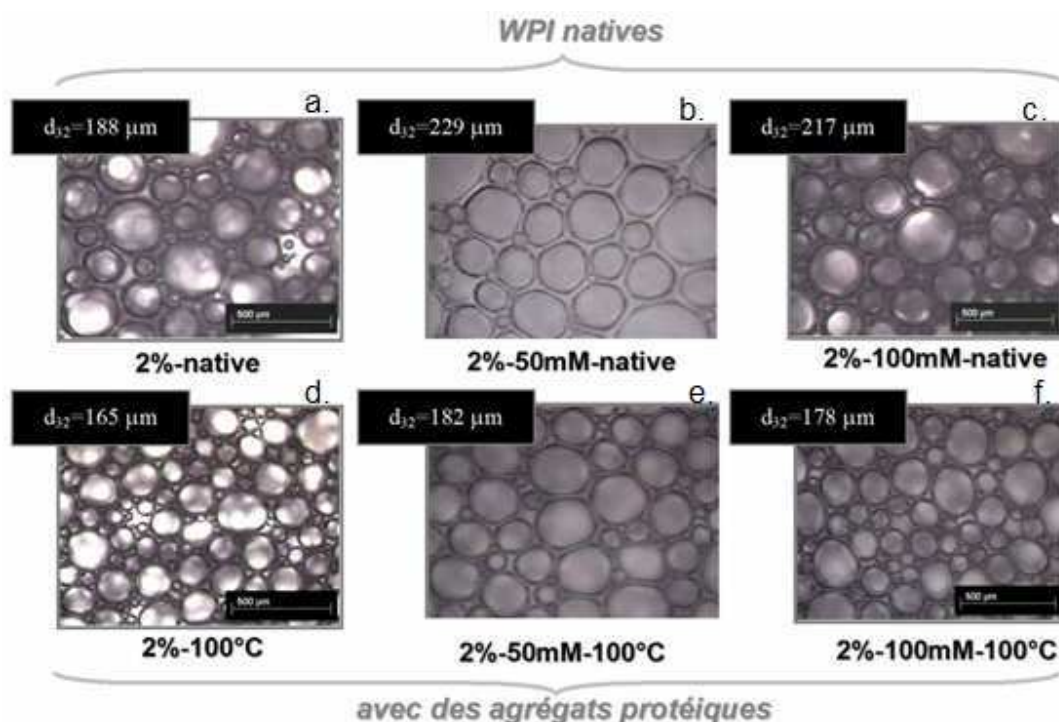


Fig. III.22. Images de bulles et évolution du diamètre de Sauter (d_{32}) dans les mousses de protéines sériques.

L'effet du sel reste cependant assez difficile à expliquer indépendamment du traitement thermique. Une différence significative a été mise en évidence au niveau des distributions de taille des bulles dans le cas de la formulation à 100 mM de NaCl selon que le traitement thermique ait été appliqué ou non. En effet, le traitement de la solution à 2% de WPI en présence de 100 mM conduit à une distribution plus uniforme des tailles de bulles dans la mousse (Figure III.23.) ; en revanche, l'ajout de sel (50 mM ou bien 100 mM) dans la solution de protéines natives nuit en général à l'uniformisation des tailles de bulles par rapport aux mousses formées à partir de solutions de protéines en l'absence NaCl.

Il faut également noter que l'effet du traitement thermique dynamique sur la taille des bulles dans les mousses protéiques a été peu étudié jusqu'à présent et que des résultats

contradictoires ont été rapportés. Hagolle et coll. (2000) ont observé une distribution plus uniforme des tailles de bulles pour les mousses à base de blanc d'œuf chauffées à 70°C, alors que Indrawati et coll. (2008) ont remarqué une augmentation significative du diamètre moyen des bulles dans les mousses de protéines sériques qui ont subi préalablement un traitement thermique, mais on retiendra qu'ils ont conduit le foisonnement à chaud, contrairement à ce travail.

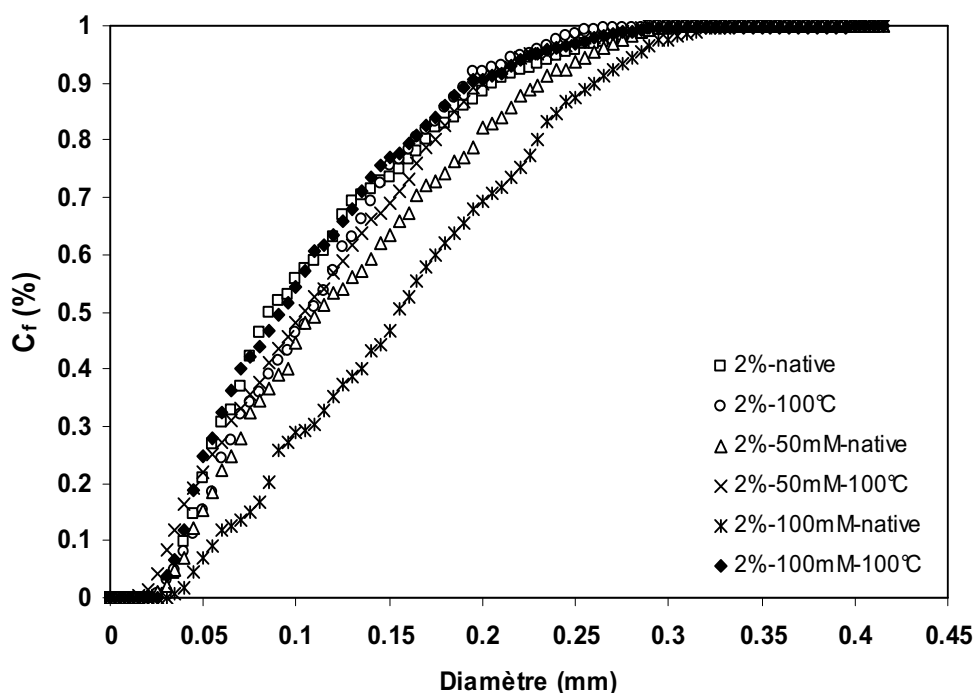


Fig. III.23. Distribution cumulée des tailles de bulles dans les mousses de protéines sériques.

Tableau III.7. Propriétés des mousses de WPI avec et sans ajout de sel.

Echantillon	TF (%)	G' (Pa) à 1Hz	t 1 ^{ère} goutte (s)	d_{32} (μ m)	10^5 TF/(d_{43}) ³
2%-native	952±8	168±4	360±55	188±6	9,1
2%-100°C	930±17	310±11	590±75	165±5	12,7
2%-100 mM-native	1063±6	270±26	750±70	217±2	8,2
2%-100 mM-100°C	1010±22	566±13	1410±130	178±7	12,0

Afin de mieux comprendre l'évolution de la microstructure des mousses, nous avons essayé de corrélérer l'évolution du diamètre moyen des bulles au taux de foisonnement en fonction de la force ionique. En effet, d_{32} et le taux de foisonnement ne sont pas des paramètres indépendants au cours du foisonnement. Dans le Tableau III.7., la comparaison entre d_{32} et les résultats obtenus sur le taux de foisonnement (TF) montre que les deux paramètres présentent une évolution similaire en fonction de la force ionique et du traitement thermique. Par conséquent, à partir de nos résultats expérimentaux, il n'est pas possible de distinguer l'origine de l'augmentation du taux de foisonnement, sachant qu'elle peut être due soit à l'augmentation du nombre des bulles, soit à l'augmentation de la taille des bulles, soit aux deux simultanément.

Afin de mieux comprendre ces évolutions, le rapport $TF/(d_{43})^3$ a été étudié. Dans celui-ci, d_{43} est le diamètre moyen en volume des bulles. En première approximation, ce rapport est proportionnel au nombre de bulles dans la mousse. Les résultats expérimentaux (Tableau III.7.) montrent une augmentation du rapport $TF/(d_{43})^3$ lorsque le d_{32} diminue. En conséquence, les mousses générées à base de solutions de WPI natives, pour qui les d_{32} les plus grands ont été observés, sont celles qui contiennent le plus petit nombre de bulles par rapport aux mousses préparées à partir des solutions traitées thermiquement. Cela démontre que les valeurs élevées du taux de foisonnement observées pour les mousses obtenues à base de WPI natives, en particulier avec 100 mM NaCl, sont principalement dues à la présence de grosses bulles, tandis que le nombre de bulles a augmenté après l'application du traitement thermique. Toutefois, comme celles-ci sont plus petites, cela s'est traduit par une légère diminution du taux de foisonnement.

En conclusion, le traitement thermique et la force ionique présentent des effets complexes sur la taille des bulles dans les mousses. L'évolution du d_{32} et celle du taux de foisonnement sont corrélées d'une manière positive, mais l'évolution de d_{32} masque partiellement les changements complexes qui ont lieu dans la distribution de tailles des bulles, notamment au niveau de la polydispersité, et qui peuvent être dus soit au NaCl, soit à la dénaturation des protéines. Tandis que le NaCl semble stabiliser les grosses bulles, le traitement thermique, tend à augmenter le nombre de bulles dans les mousses et modifie surtout la forme de la distribution granulométrique des bulles en la déplaçant vers les tailles les plus petites. Ceci conduit même à des distributions des tailles encore plus uniformes lorsque le traitement thermique et l'ajout de NaCl sont combinés, ce qui laisse présager une amélioration significative des propriétés foisonnantes pour les solutions de WPI dénaturées. Par conséquent, on peut maintenant s'attendre à ce que la force

ionique et le traitement thermique constituent des leviers capables de modifier à la fois la texture d'une mousse, mais aussi sa stabilité dans le temps.

Texture des mousses

Dans notre travail, la diminution du diamètre de Sauter décrite précédemment, ainsi que la répartition plus uniforme des tailles de bulles dans les mousses à base de WPI dénaturées due à la formation d'agrégats protéiques, par rapport aux mousses formées à partir de solutions natives de WPI, devraient se traduire à taux de foisonnement quasiment constant par une meilleure stabilité des mousses contre le drainage et le disproportionnement, ainsi que par une texture plus ferme résultant de l'augmentation de l'aire interfaciale qui induit une élasticité interfaciale plus élevée. En effet, lors de cette étude nous avons observé une amélioration nette de la rigidité des mousses pour les échantillons sans ou avec sel, ayant subi un traitement thermique (Figure III.24.).

La texture des mousses a été estimée au moyen de la mesure du module élastique (G'), du module visqueux (G'') et de la tangente de perte ($\tan\delta$) sous cisaillement, qui permettent d'évaluer à la fois la rigidité, ainsi que le caractère solide des mousses. En effet, dans la littérature, les mesures rhéologiques en mode dynamique sont étroitement liées à la texture, mais aussi à la libération des arômes et donc au goût des aliments (Gunasekaran & Ak, 2000). De même, la texture est fortement liée à la durée de vie, à l'aspect visuel et à la saveur des aliments de type mousse (McClements, 1999). Un lien étroit existe aussi entre la texture et la distribution de taille des bulles (Raharitsifa, Genovese, & Ratti, 2006).

Dans le cadre de notre travail, G' s'est tout d'abord montré fortement influencé à la fois par la force ionique et par le traitement thermique à 100°C, comme cela est illustré par les valeurs de G' dans le Tableau III.7. La rigidité est fortement améliorée pour les mousses à base de WPI dénaturées thermiquement, mais aussi lorsque 50 mM ou 100 mM de NaCl sont ajoutés. Par exemple, les valeurs de G' des mousses préparées à base de WPI traitées thermiquement sont deux fois plus élevées que celles que nous avons observées dans le cas des mousses obtenues à partir de WPI natives. D'un point de vue théorique, G' dépend essentiellement de la fraction volumique de gaz $\epsilon = TF/(1+TF)$ dans le cas des mousses sèches, mais aussi de la tension de surface σ et de d_{32} . Le modèle le plus connu qui relie ces différents paramètres a été proposé par Princen & Kiss (1986) :

$$G' = 2k \cdot \frac{\sigma}{d_{32}} \cdot \epsilon^a \cdot (\epsilon - \epsilon_c) \quad \text{Equation III.1.}$$

avec $k=1,77$, $a=1/3$ et $\epsilon_c=0,712$. Dans le cas des mousses polyédriques, les constantes a et ϵ_c ne dépendent que faiblement de la distribution de tailles des bulles, mais dans le cadre de notre étude, ces valeurs peuvent varier plus significativement puisque la morphologie des bulles dans nos mousses se situe quelque part entre celle des mousses polyédriques et celle des mousses sphériques. Ce phénomène est spécifique aux mousses présentant un TF très élevé et une polydispersité significative des bulles. Dans ce travail, les images présentées sur la Figure III.22. confirment que, malgré la fraction très élevée de gaz incorporé (environ 90%), les mousses de protéines ne sont pas polyédriques, ce qui limite l'applicabilité de l'Equation III.1. Par exemple, *Mason, Bibette & Weitz (1995)* ont signalé des valeurs très différentes pour a et ϵ_c de celles trouvées par *Princen & Kiss (1986)* pour les paramètres de l'Equation III.1. pour des gouttelettes sphériques dans les émulsions, $a=1$ et $\epsilon_c=0,63$, alors que *Höhler, Cohen-Addad & Asnacios (1999)* ont signalé que k dépend également de l'arrangement spatial des bulles dans une mousse.

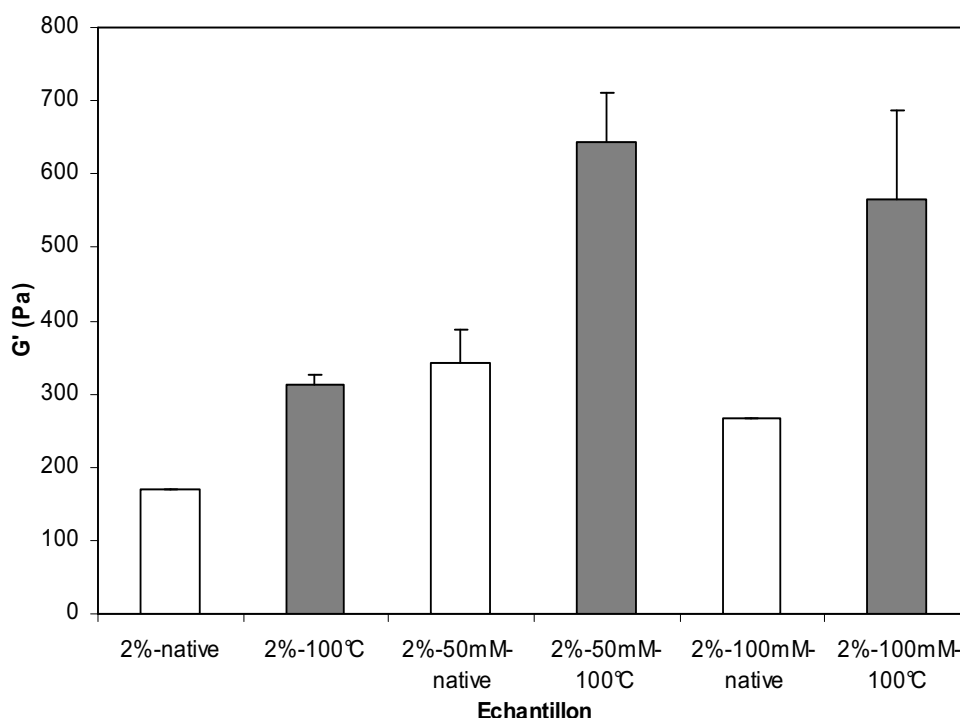


Fig. III.24. Evolution du module élastique G' dans les mousses de protéines sériques (à 1 Hz et pour une déformation de 0,5%).

Suite au traitement thermique, les données expérimentales présentées dans les Figure III.21. et Figure III.22. ont montré que la fraction volumique de gaz (ϵ) est presque constante, que σ a augmenté d'environ 10% et que d_{32} a diminué. Par conséquent, G' devrait augmenter, ce qui est en accord avec les données expérimentales (Figure III.24.). En revanche, l'augmentation de la force ionique a augmenté ϵ et d_{32} et σ diminue sensiblement (Figure III.21 et Figure III.22.), ce qui devrait entraîner de plus faibles valeurs de G' si l'on prend en compte l'Equation III.1. Pourtant, les résultats expérimentaux n'ont pas suivi cette tendance théorique. Cela peut probablement s'expliquer par la diminution de la polydispersité observée quand on ajoute 100 mM de NaCl (Figure III.22.), ce qui devrait affecter principalement k et n'est pas pris en compte dans l'Equation III.1.

On notera également que la solution qui contient la proportion la plus élevée d'agréats solubles (2%-50 mM-100°C) est celle qui a formé la mousse présentant la fermeté la plus élevée. Puisque la fraction de gaz est presque constante, on peut conclure que ce sont les agrégats formés au cours du traitement thermique qui sont en grande partie responsables de l'amélioration de la texture des mousses.

Afin de mieux comprendre la relation qui existe entre, d'une part la force ionique et le traitement thermique des solutions de WPI, et d'autre part la rigidité et le d_{32} des mousses, nous avons comparé les résultats obtenus sur les solutions de WPI caractérisées par la force ionique la plus faible (0 mM NaCl) et la plus élevée (100 mM NaCl), avec et sans traitement thermique. La comparaison des résultats expérimentaux est illustrée par la Figure III.25.

Ainsi, la Figure III.25. montre une interaction intéressante entre d_{32} , l'ajout de NaCl, le traitement thermique et le caractère liquide (c'est-à-dire $\tan\delta$ à une déformation de 0,5% et une fréquence de 1 Hz) et donc la texture des mousses. En effet, bien que le traitement thermique appliqué aux solutions de WPI ait augmenté G' (Figure III.24.), une dénaturation complète des protéines sériques et la formation des gros agrégats insolubles suite au traitement thermique des solutions protéiques sans NaCl a conduit à une augmentation de $\tan\delta$, ce qui correspond à une perte du caractère solide. En revanche, la présence de 100 mM de NaCl a diminué $\tan\delta$ et a augmenté G' , à la fois dans le cas des protéines natives et des protéines dénaturées. Cet effet est cependant resté assez faible lorsque le traitement thermique a été appliqué, sans doute parce que seulement 10% des WPI ont été dénaturées dans ce cas (Tableau III.1.). Il convient en effet de rappeler qu'en présence d'une force ionique élevée, le niveau de dénaturation thermique est resté

limité et aussi que les agrégats formés appartiennent principalement à la fraction soluble, ce qui pourrait expliquer les différences observées sur le $\tan \delta$ des mousses après traitement thermique avec et sans NaCl.

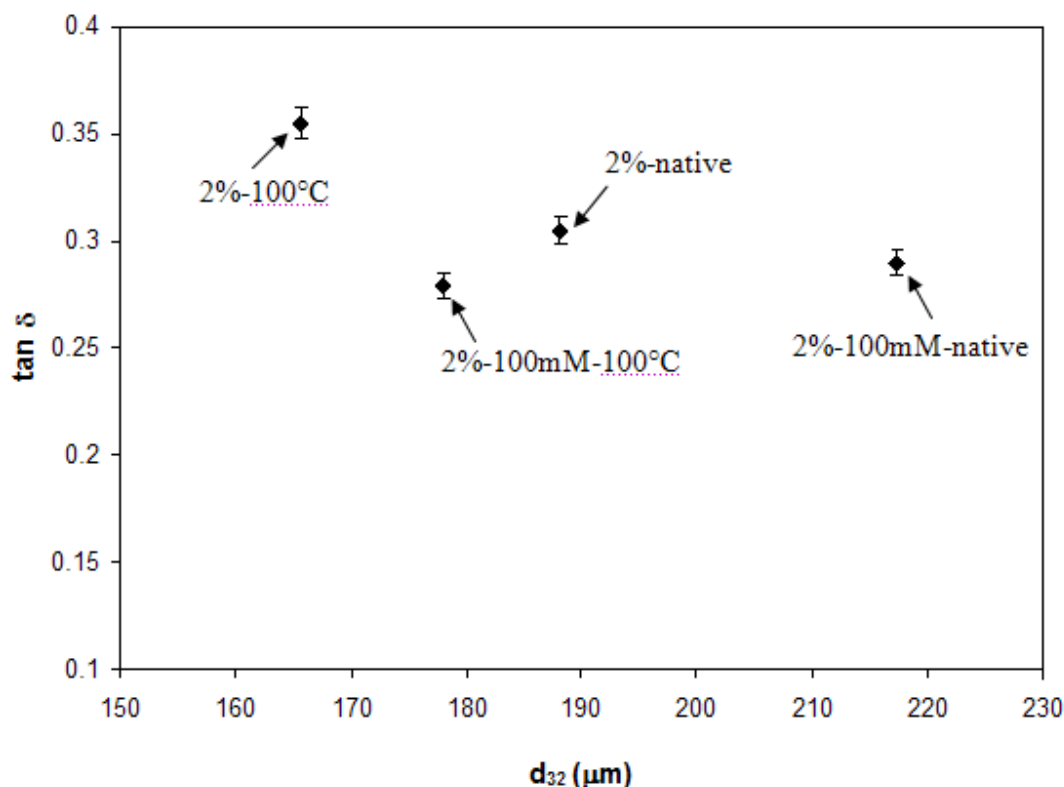


Fig. III.25. Représentation de $\tan \delta$ en fonction du diamètre moyen d_{32} .

En conclusion, l'agrégation des protéines par traitement thermique dynamique induit toujours une augmentation de G' pour les mousses de protéines sériques. Toutefois, lorsque la dénaturation est presque complète et que des gros agrégats insolubles se forment, les mousses sont certes plus consistantes, mais elles présentent un comportement plus proche d'une phase fluide. Au contraire, lorsque la dénaturation est limitée et que les agrégats formés appartiennent principalement à la fraction soluble, cela accroît considérablement G' et renforce la solidité des mousses. Comme attendu, une dénaturation thermique dynamique des protéines sériques peut donc être utilisée pour contrôler la texture des mousses, sachant qu'elle va nécessairement affecter en retour leur stabilité dans le temps.

Stabilité des mousses

La stabilité contre le drainage des mousses dépend principalement de la viscosité de la solution initiale, ainsi que de la présence d'agents stabilisants, à la fois dans les films liquides et au niveau des bords de Plateau (*Narshiman & Ruckenstein, 1995 ; Pugh, 1996*). Dans ce travail, la viscosité ne semble pas jouer un rôle clef, principalement en raison de la faible quantité de protéines en solution (2% w/v). Seuls les effets de la force ionique et de l'aggrégation des protéines sur leur adsorption aux interfaces gaz-liquide seront donc pris en considération.

Par conséquent, la stabilité de la mousse dépend de la capacité des protéines localisées à l'interface à constituer un réseau cohésif par des liaisons covalentes et non-covalentes. Dans les mousses stables, ce film interfacial peut résister aux perturbations physiques et au rapprochement des films adjacents. *Bals & Kulozik (2003)* ont affirmé que, à cause du déplissement des protéines sériques et de l'exposition des groupements réactifs, des films interfaciaux stables peuvent être construits. Ces films interfaciaux sont stabilisés principalement par des ponts disulfures et par des interactions hydrophobes (*Kinsella, 1981*), ce qui est en accord avec nos résultats obtenus par SDS-PAGE. L'addition de NaCl joue également un rôle clef sur la stabilité de la mousse car elle agit sur les forces de répulsion électrostatiques et augmente la quantité de protéines adsorbées. Bien que *Ibanoglu & Karatas (2001)* aient constaté que le taux de foisonnement et la stabilité des mousses ont été réduits lorsque la molarité de leur tampon a été augmentée de 50 mM à 100 mM, le chlorure de sodium est généralement considéré comme un additif qui améliore la stabilité des mousses à base de protéines de blanc d'œuf (*Raikos, Campbell & Euston, 2007*).

L'évolution de la stabilité contre le drainage des mousses de protéines sériques est illustrée sur la Figure III.26. On peut dès à présent noter que pour notre formulation qui présente la fermeté la plus élevée (2%WPI-50 mM-100°C), la stabilité contre le drainage exprimée par le temps d'apparition de la première goutte diminue fortement (Figure III.26.). Il semble donc qu'une proportion trop élevée d'agrégats solubles ou bien insolubles nuise à la stabilité des mousses, alors qu'une quantité plus faible semble au contraire accroître la stabilité dans le temps des mousses de protéines. En même temps, les résultats obtenus précédemment par SEC montrent clairement que la proportion d'agrégats solubles la plus importante a été atteinte pour le traitement thermique d'une solution à 50 mM NaCl ; toutefois, les mousses formées à partir de

cette solution traitée ont fait apparaître une déstabilisation plus rapide (Figure III.26.). La tendance à l'effondrement de la mousse semble augmenter quand la proportion d'agrégats dans la fraction soluble est élevée (70% w/w), même ceux-ci constituent de puissants modificateurs de texture puisque ces agrégats augmentent fortement la fermeté des mousses (Figure III.24.).

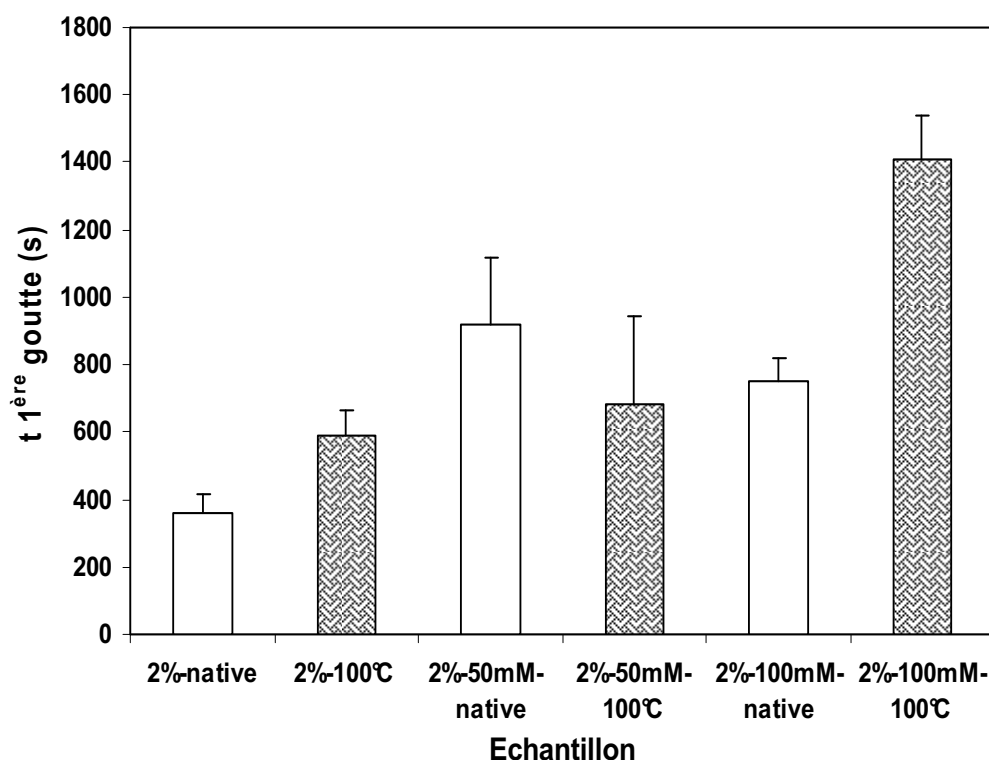


Fig. III.26. Evolution de la stabilité contre le drainage des mousses de protéines sériques.

Il semble donc que la maîtrise de la proportion d'agrégats dans la fraction soluble soit primordiale pour la formation d'une mousse ferme et stable et qu'un compromis entre texture et stabilité soit nécessaire. Dans notre étude, une valeur de 17% w/w d'agrégats solubles semble correspondre à ce compromis pour la formation de mousses à la fois stables et fermes. Dans un tel système, il peut déjà y avoir des interactions entre les agrégats de plusieurs interfaces, ce qui aboutit vraisemblablement à la formation d'un réseau de bulles liées entre elles par des agrégats formant des « clusters ». Il est cependant clair que la force de ce réseau dépend de la quantité d'agrégats solubles présents, ce qui explique pourquoi on observe un optimum de stabilité. Si la proportion d'agrégats est trop élevée (70% w/w, par exemple), on n'observe plus

expérimentalement un simple drainage du liquide, mais une chute brutale de fractions cohérentes de mousse. En effet, une proportion trop élevée d'agrégats dans la fraction soluble semble conduire à la formation de larges structures cohérentes dans la mousse qui vont tomber en bloc pendant les expériences de drainage, comme des solides. Ceci confirme la formation d'un réseau bulles/agrégats, mais avec une cohésion tellement forte qu'elle nuit en fin de compte à la stabilité de la mousse. Une autre raison susceptible d'expliquer la déstabilisation des mousses à forte teneur en agrégats protéiques est la présence d'une quantité importante d'agrégats insolubles qui croît en général avec la proportion d'agrégats solubles. Même si les agrégats insolubles vont préférentiellement se placer aux bords de Plateau, on peut faire l'hypothèse que leur taille et leur forme peuvent entraîner une déformation des films liquides et ainsi accélérer le processus de déstructuration de la mousse.

De nombreux travaux de recherche ont montré que la rhéologie interfaciale et la stabilité de la mousse sont corrélées : on citera par exemple, *Davis & Foegeding (2004)*, *Rouimi, Schorsch, Valentini, & Vaslin (2005)*, *Davis & Foegeding (2007)*, *Miller et coll. (1998)*, *Martin et coll. (2002)*, etc. Toutefois, puisque les interfaces jouent un rôle clef sur la rhéologie des mousses sèches, il existe nécessairement une corrélation entre la rhéologie de la mousse et la rhéologie interfaciale et donc, indirectement, une corrélation entre la rhéologie de la mousse et sa stabilité. En conséquence, la stabilité de la mousse contre le drainage devrait être fortement liée à ses propriétés rhéologiques.

Afin de mieux comprendre la relation développée entre, d'une part la force ionique et le traitement thermique des solutions de WPI, et d'autre part la composante élastique (G') et la déstabilisation des mousses par drainage (t 1^{ère} goutte), nous avons tout d'abord étudié comparativement les résultats obtenus à partir des solutions de WPI, respectivement à force ionique faible (0 mM NaCl) et à force ionique élevée (100 mM NaCl). Ainsi, l'évolution des valeurs du G' pour un balayage en temps (Figure III.27.) a été comparée avec les courbes de drainage (Figure III.26.).

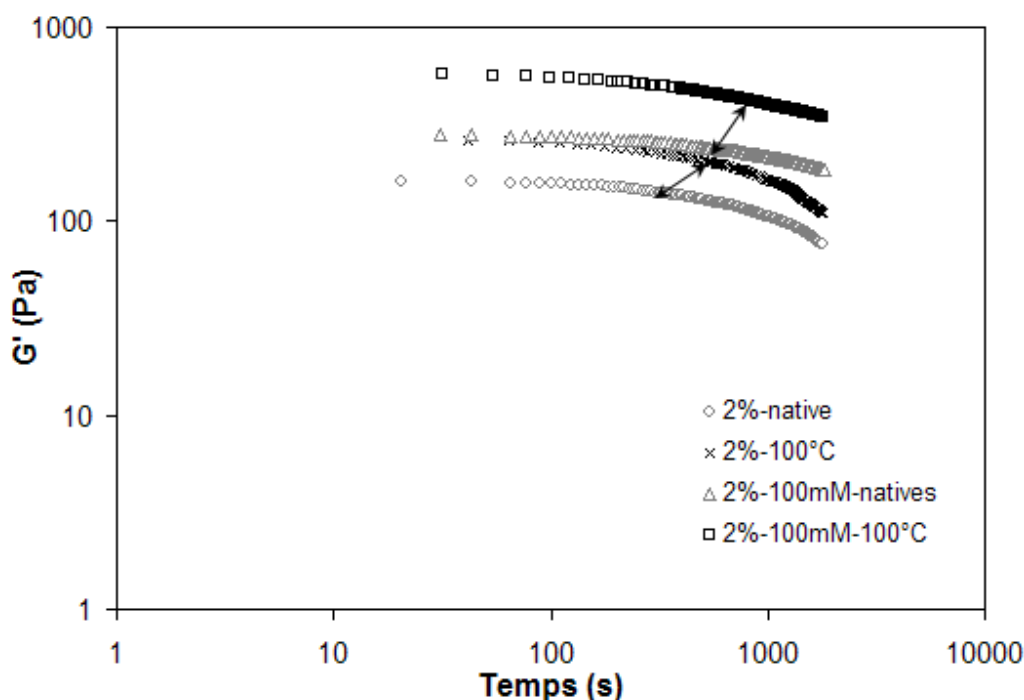


Fig. III.27. Evolution de G' au cours du temps pour des mousses protéiques à 1 Hz et 0,5% de déformation.

Sur la Figure III.26., une amélioration de la stabilité exprimée à partir du temps de 1^{ère} goutte est observée en présence de NaCl et suite à l'application du traitement thermique ; elle semble donc suivre les mêmes tendances que le module conservatif (G') sur la Figure III.27. D'autre part, on notera que la seule mousse qui s'est effondrée au cours des expériences de drainage (100°C-sans sel) correspondait à celle présentant le $\tan\delta$ le plus élevé sur la Figure III.25., ce qui confirme que l'élasticité et la solidité doivent être prises en compte simultanément et indépendamment l'une de l'autre.

Enfin, à la fois les expériences de drainage et les tests rhéologiques dynamiques de balayage en temps sont en accord avec nos attentes basées sur les résultats décrits précédemment dans les sections « Capacité foisonnante », « Distributions de tailles des bulles » et « Texture des mousses » : tout d'abord, les mousses présentant les plus petites bulles, le G' le plus élevé et le $\tan\delta$ le plus petit présentent la stabilité la plus marquée ; de plus, la mousse la plus stable est obtenue lorsque le degré de dénaturation est limité à 10% et lorsque des agrégats de taille intermédiaire se forment, alors que l'effondrement se produit seulement dans le cas d'une dénaturation complète des protéines, caractérisée par la formation des gros agrégats insolubles.

En conclusion, nous avons démontré grâce à ce travail que l'application d'un traitement thermique aux solutions de protéines sériques a radicalement modifié leurs propriétés foisonnantes. Une forte interaction entre le traitement thermique et la force ionique a également été démontrée. Les résultats expérimentaux obtenus nous indiquent qu'une dénaturation limitée des protéines, d'environ 10%, en raison de la présence de 100 mM NaCl améliore de manière significative certaines propriétés des mousses à base de WPI. Toutefois, nos résultats ont aussi démontré que le traitement thermique, en l'absence aussi bien qu'en présence de sel, n'améliore pas le taux de foisonnement. En revanche, effectuer un traitement thermique en présence d'une quantité importante de NaCl (100 mM) améliore fortement la texture, ainsi que la stabilité des mousses. Les données expérimentales ont également montré que passer d'une proportion de 8% w/w (cas du traitement thermique sans sel) à une proportion de 70% w/w d'agrégats solubles (cas du traitement thermique en présence de 50 mM NaCl) conduit à une forte amélioration de la fermeté, mais également à une déstabilisation plus rapide des mousses, alors que l'on améliore à la fois la texture et la stabilité lorsque la proportion des agrégats solubles est de 17% w/w (100 mM NaCl), grâce au fait qu'une force ionique élevée permet de limiter à la fois la dénaturation et l'agrégation des protéines à traitement thermique fixé. Enfin, nous avons pu constater que la stabilité des mousses contre le drainage dépend également assez fortement de la maîtrise de la proportion d'agrégats solubles et qu'il existe un optimum de stabilité assurant à la fois une plus grande fermeté et une meilleure stabilité dans le temps.

On retiendra donc en fin de compte que le traitement thermique et la force ionique jouent un rôle important sur les phénomènes de dénaturation et d'agrégation des protéines, ainsi que sur la durée de vie et la texture des mousses protéiques. A taux de foisonnement constant, ce qui est quasiment le cas dans nos expériences, nos résultats semblent mettre en évidence le rôle clef des agrégats protéiques solubles puisque la rigidité et la stabilité des mousses produites à partir des solutions dénaturées sont améliorées par rapport aux mousses formées à partir de solutions natives lorsqu'il y a 17% w/w d'agrégats solubles. La transposition de ces résultats à l'échelle industrielle devrait donc permettre d'améliorer significativement la stabilité et les propriétés organoleptiques des aliments présentant une structure de mousse.

II.4. EFFET DE LA TEMPERATURE DE DENATURATION SEULE. DETERMINATION DE LA TEMPERATURE DE DENATURATION LA PLUS ADAPTEE AU FOISSONNEMENT

Jusqu'à présent, l'étude systématique de l'influence de la dénaturation et de l'agrégation des protéines induites par chauffage sur les propriétés foissonnantes des WPI est restée limitée (Zhu & Damodaran, 1994; Davis & Foegeding, 2004 & 2007), tandis qu'une littérature abondante existe sur les protéines purifiées de lactosérum, en particulier la β -Lg (Philips, Hawks & German, 1995 ; Marin & Relkin, 1999; Leman & Dolgan, 2004; Kim, Cornec & Narsimhan, 2005; Croguennec et coll., 2006). De plus, dans les articles cités précédemment, la dénaturation des protéines a toujours été réalisée à l'aide de traitements thermiques en statique avec des conditions hydrodynamiques très différentes de celles des traitements thermiques en dynamique appliqués dans l'industrie alimentaire au moyen d'échangeurs à chaleur, ces dernières correspondant également à celles de notre étude.

Il a déjà été démontré que le traitement thermique des protéines globulaires, telle que la β -Lg, la principale protéine des WPI, est un moyen intéressant de renforcer leurs propriétés technofonctionnelles, en particulier en ce qui concerne la texture et la stabilité d'une mousse. Toutefois, les interactions entre β -Lg et α -La peuvent également jouer un rôle considérable pendant le traitement thermique des WPI, et cela pourrait affecter en retour les propriétés physiques des mousses stabilisées par les agrégats protéiques de WPI (Schokker, Creamer & Singh, 2000).

Les résultats présentés dans cette section et notamment dans le Tableau III.8. sont centrés sur l'étude de l'impact de la température de chauffage des solutions de WPI sur les propriétés physico-chimiques de la mousse.

Tableau III.8. Impact de la température du traitement thermique sur les propriétés des mousses.

<i>Echantillon à 2% w/v WPI et 50mM</i>	<i>TF (%)</i>	<i>G' (Pa) à 1Hz</i>	<i>t 1^{ère} goutte (s)</i>	<i>d₃₂ (μm)</i>	<i>Span</i>
native	1001±15	342±47	918±196	229	1,68
70°C	1002±17	342,5±46	920±194	230	1,70
80°C	1010±3	561±46	1220±168	180	1,33
90°C	990±7	618±16	1280±55	174	1,40
100°C	963±8	644±68	680±260	180	1,50

Elle aura aussi pour but de confronter nos résultats à ceux de la littérature, de façon à rechercher les points communs, mais aussi les différences ; celles-ci peuvent résulter tout d'abord de l'utilisation d'un traitement thermique dynamique, mais aussi de la complexité des interactions entre traitement thermique/force ionique, ainsi que de celle des interactions entre traitement thermique/concentration de WPI, ce qui avait été déjà signalé dans le paragraphe précédent.

Capacité foisonnante

L'aptitude au foisonnement des solutions de WPI natives ou dénaturées par chauffage a été étudiée en fonction de la température de traitement entre 70°C et 100°C. La Figure III.28. montre que les mousses obtenues à partir de WPI traitées thermiquement ne présentent aucune amélioration de la capacité foisonnante ; les résultats font apparaître au contraire une légère diminution du taux de foisonnement. Des analyses statistiques ont confirmé que seule la solution de WPI dénaturée à 100°C a donné un taux de foisonnement significativement différent du reste des mousses de WPI. Dans cette étude, les agrégats formés suite au traitement thermique semblent donc jouer un rôle ambivalent sur la formation de la mousse, mais en accord toutefois avec les courbes d'adsorption des protéines présentées sur la Figure III.13. Ce comportement est également en accord avec la littérature (*Bals & Kulozik, 2003; Davis & Foegeding, 2004*) puisque la polymérisation et l'agrégation des WPI induites par chaleur semblent réduire la capacité foisonnante des protéines, même si certaines études ont démontré que la dénaturation et l'agrégation des protéines sériques pourraient au contraire accroître le taux de foisonnement des mousses. Par exemple, *Zhu & Damodaran (1994)* ont affirmé que les molécules natives vont s'adsorber plus rapidement à l'interface, en contribuant de cette manière à l'amélioration de la capacité foisonnante, alors que les molécules de WPI traitées thermiquement ne vont venir s'adsorber qu'après l'adsorption des protéines non-agrégées et elles vont essentiellement contribuer principalement à la stabilité du film protéique interfacial. Les mêmes auteurs ont observé un maximum de capacité foisonnante lorsque le rapport WPI natives/WPI polymérisées est 60/40. D'autre part, *Ibanoğlu & Karataş (2001)* ont remarqué une amélioration du taux de foisonnement à pH 7,0 lorsque la dénaturation des protéines a été induite par des traitements hautes pressions, ce qui confirme le rôle ambivalent de la dénaturation des protéines sur la formation de la mousse avec présence éventuelle d'un optimum.

Dans ce travail, on a observé que le taux de foisonnement dépend peu du traitement thermique et même qu'il décroît légèrement lorsque la température de traitement augmente, mais uniquement pour la solution protéique chauffée à 100°C. Pour expliquer ce comportement, nous avons essayé d'établir une corrélation entre d'une part le taux de foisonnement, et d'autre part la quantité de protéines dénaturées non-agrégées, la fraction de protéines insolubles, ainsi que la fraction agrégée des protéines solubles (Tableau III.2. et Figure III.28.).

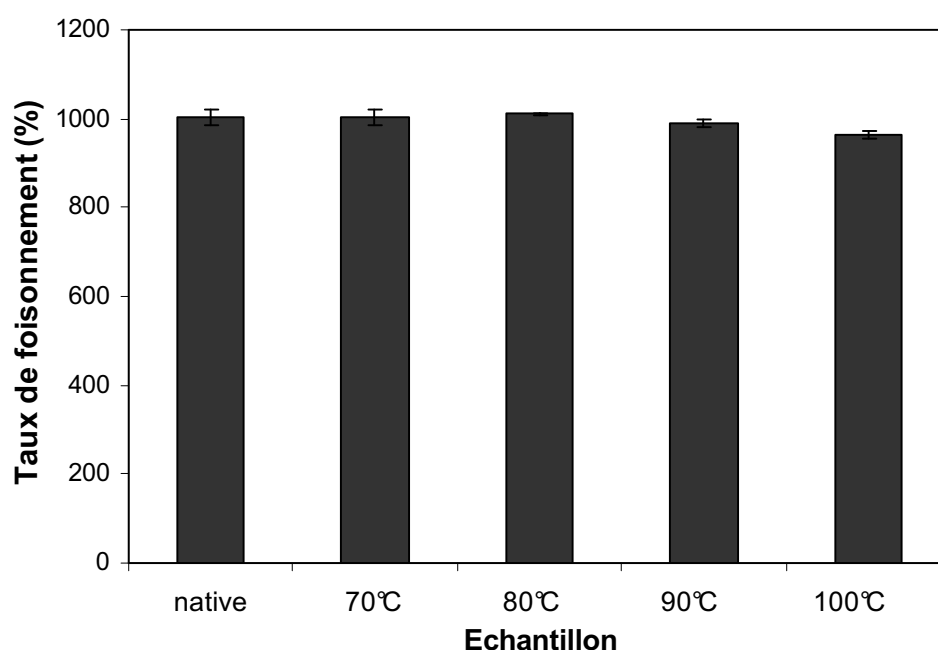


Fig. III.28. Evolution du taux de foisonnement pour les mousses préparées à partir des solutions natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

Cette corrélation nous a permis de démontrer que l'évolution du taux de foisonnement ne peut pas être expliquée par celle de la fraction insoluble, du niveau de dénaturation ou bien du diamètre moyen des agrégats solubles calculé par DLS (Tableau III.2.), alors qu'au contraire, l'évolution de la fraction soluble est similaire à celle du taux de foisonnement et joue certainement un rôle sur les interfaces gaz-liquide (Figure III.13.). *Zhu & Damodaran (1994)* avaient déjà signalé qu'il existe une proportion optimale de protéines polymérisées, correspondant à un compromis entre la formation de la mousse (favorisée par les monomères) et la stabilité de la

mousse (améliorée par des polymères). Probablement, dans notre cas, les protéines solubles non-agrégées commencent à faire défaut suite à un traitement thermique à 100°C, ce qui expliquerait la diminution du taux de foisonnement. Ce comportement n'est pas apparu pendant les mesures de la tension de surface parce que l'aire interfaciale est très faible et que dans ce cas, la diffusivité plus faible des agrégats vers les interfaces a été compensée par la présence de monomères dénaturés (Figure III.13.), alors que la proportion des protéines dénaturées non-agrégées peut également devenir insuffisante lorsque le taux de foisonnement atteint 1000%.

Dans notre travail, le pourcentage de protéines non-agrégées calculé sur la teneur totale en protéines (2% w/v) peut être estimé par un bilan matière à partir du pourcentage de protéines solubles obtenu par pesée après centrifugation et du pourcentage de protéines solubles agrégées dans les surnageants mesuré par SEC (Tableau III.2.). Cette analyse montre que le taux de foisonnement commence à diminuer lorsque les protéines solubles non-agrégées représentent moins de 30% w/w de la teneur totale en protéines. En effet, dans le cas de la solution chauffée à 80°C, la teneur totale en protéines solubles non-agrégées est de 84% w/w, alors que dans le cas d'un chauffage à 90°C, elle n'est plus que de 45% w/w. Puisque le taux de foisonnement n'a diminué que légèrement quand le montant total des protéines solubles non-agrégées est passé à 27% w/w à 100°C, une valeur de 30% w/w de protéines non-agrégées peut être considérée comme une première estimation de la valeur minimale requise pour la formation d'une mousse abondante.

Distribution de taille des bulles

L'influence du traitement thermique sur la distribution granulométrique des tailles de bulles et sur le diamètre moyen des bulles dans les mousses est illustrée qualitativement et quantitativement par la Figure III.29. D'après la Figure III.29.a., nous pouvons observer que les mousses préparées à partir des solutions natives et chauffées à 70°C présentent le diamètre de Sauter (d_{32}) le plus élevé et qu'une augmentation du nombre de bulles dans la mousse se produit lorsque les mousses sont générées à partir de solutions traitées à des températures supérieures à 80°C. En pratique, le diamètre de Sauter (Equation II.12) des mousses obtenues à partir des solutions natives est statistiquement égal à celui des mousses formées à partir des solutions traitées à 70°C, tandis que les d_{32} des trois mousses formées à partir des solutions dénaturées à 80°C ou plus sont également

statistiquement identiques, mais leur valeur est significativement inférieure à celle obtenue pour une température de traitement inférieure ou égale à 70°C.

Dans tous les cas, les distributions de tailles des bulles sont toujours bimodales. La Figure III.29.b. montre une différence significative entre les distributions de taille des bulles observées pour les mousses à base de protéines natives/chauffées à 70°C et celles des mousses de protéines chauffées à une température supérieure à 80°C. La largeur de la distribution de taille des bulles a également été estimée en utilisant le « Span » (Equation II.1.) qui suit exactement le même comportement que le diamètre de Sauter (données non présentées). En conséquence, on retiendra que lorsqu'une diminution significative du diamètre de Sauter a été mesurée suite au traitement thermique, elle a été toujours accompagnée par diminution de la largeur de la distribution en taille des bulles par rapport aux mousses natives.

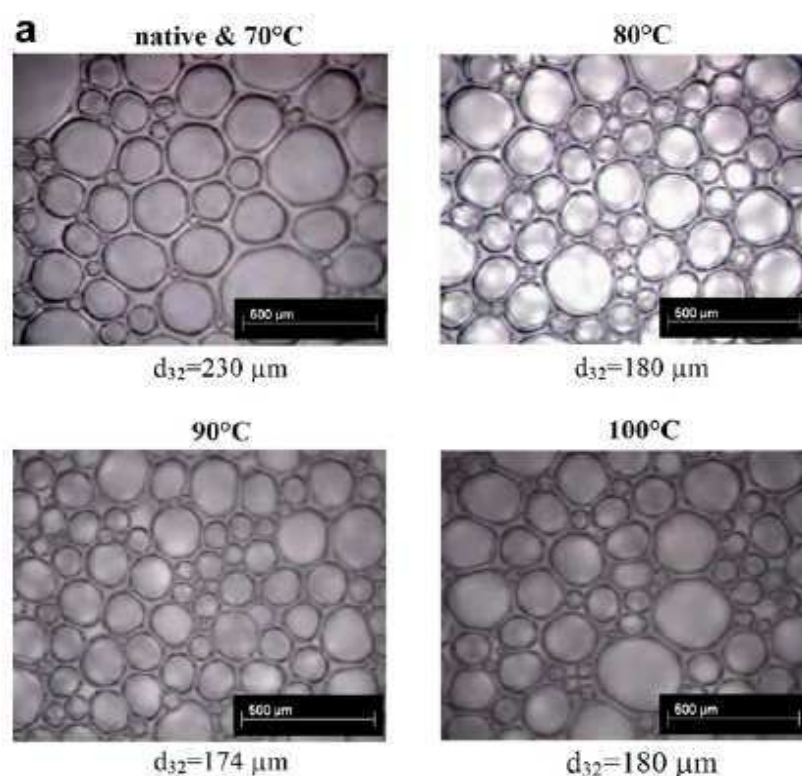


Fig. III.29.a. Images des bulles et évolution du diamètre de Sauter (d_{32}) pour les mousses préparées à partir des solutions natives et traitées thermiquement entre 70°C et 100°C.

Dans la littérature, il faut noter que l'effet du traitement thermique sur la taille moyenne des bulles, ainsi que sur la distribution des tailles de bulles dans les mousses protéiques a été

relativement peu étudiée jusqu'à présent. Parmi les rares travaux reportés, *Hagolle et coll. (2000)* ont étudié l'effet de la chaleur sur les mousses à base de blanc d'œuf et ils ont remarqué que chauffer la solution d'ovalbumine à 70°C a entraîné une réduction du diamètre moyen des bulles, ainsi qu'une distribution plus uniforme de leur taille, bien que d'autres chercheurs aient montré que le traitement thermique des solutions de WPI peut augmenter le diamètre moyen des bulles dans la mousse. Par exemple, lorsque la formation de la mousse et le traitement thermique sont conduits simultanément, *Indrawati et coll. (2008)* ont observé une augmentation significative de la taille moyenne des bulles dans les mousses formées à partir de caséinates de sodium et de protéines sériques.

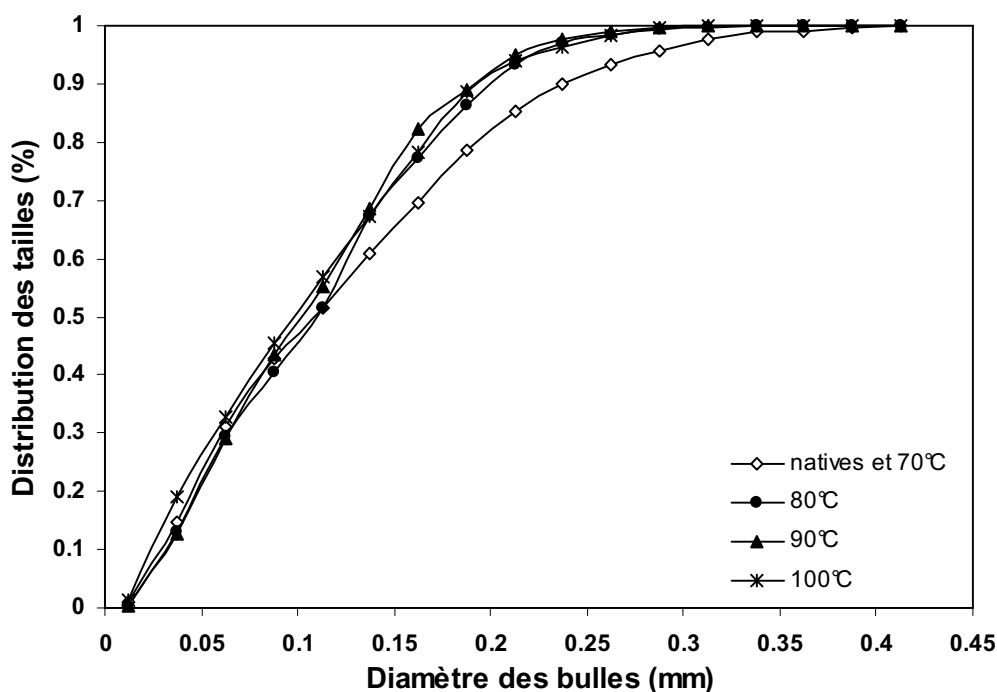


Fig. III.29.b. Distribution cumulée des tailles de bulles pour les mousses protéiques.

Une explication possible du fait que lorsqu'on applique un traitement thermique supérieur à 70°C, une réduction de d_{32} accompagnée d'une distribution plus uniforme des bulles dans la mousse est observée par rapport aux WPI natives est la présence d'agrégats protéiques solubles. Leur présence a déjà permis d'expliquer précédemment une meilleure stabilisation des mousses de WPI, mais seulement lorsque leur quantité reste limitée. Les résultats de cette section confirment cette conclusion. En effet, réduire la taille moyenne et obtenir des distributions de tailles plus étroites sont des évolutions qui accroissent la stabilité des mousses protéiques, ce qui

est en accord avec les résultats de la littérature stipulant qu'il y aurait une amélioration de la stabilité des interfaces eau/air lorsqu'un traitement thermique est appliqué aux protéines (Davis & Foegeding, 2004). Ici, une proportion de 10% w/w d'agrégats solubles, soit un traitement à 80°C, semble en effet être suffisante pour jouer ce rôle positif, alors qu'une augmentation plus importante de la teneur en agrégats solubles n'a plus d'effet ni sur d_{32} , ni sur la largeur de la distribution des tailles de bulles dans nos mousses (Tableau III.2.).

Texture des mousses

Comme nous l'avons vu précédemment, la dénaturation thermique des protéines de lactosérum pourrait constituer un outil intéressant pour contrôler la texture des mousses et donc la durée de vie et l'aspect des aliments de type mousse. Il s'agit ici d'optimiser la température du traitement thermique.

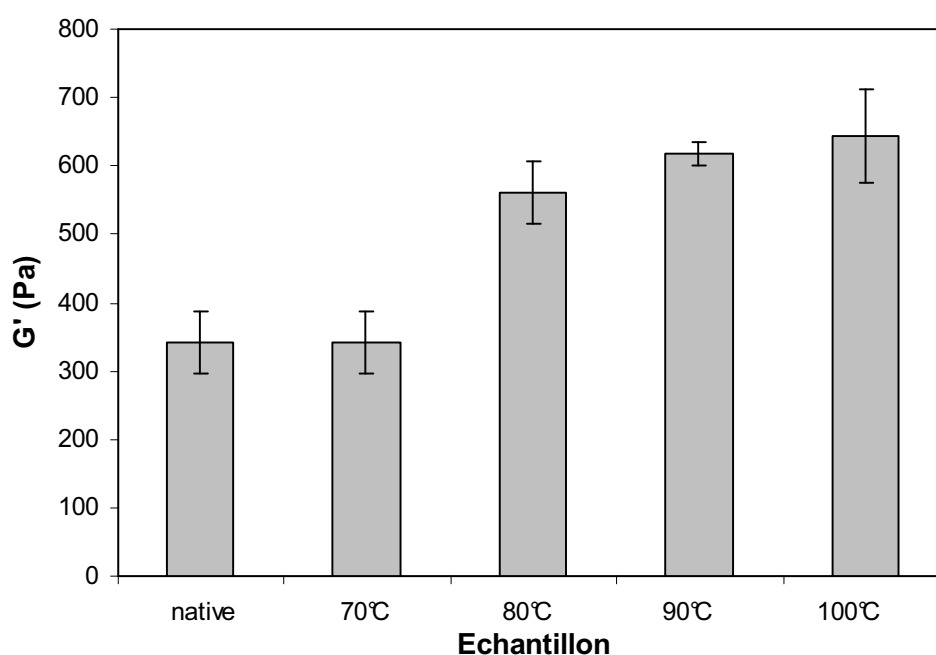


Fig. III.30. Evolution de la rigidité pour les mousses préparées à partir des solutions natives et traitées thermiquement dans une gamme de température comprise entre 70°C et 100°C.

Dans ce travail, la texture de la mousse a été estimée en utilisant à nouveau le module élastique (G'). Tout d'abord, nous avons trouvé que G' est fortement influencé par le traitement

thermique, comme cela apparaît clairement sur la Figure III.30. En effet, la rigidité de la mousse augmente fortement pour les échantillons traités thermiquement à des températures supérieures à 80°C. Par exemple, les valeurs de G' des mousses préparées avec des solutions traitées au-delà de 80°C sont environ deux fois plus élevées que les G' observés pour les mousses générées à partir de protéines natives ou traitées à 70°C. Dans le cas des mousses à base de protéines dénaturées à 90°C et à 100°C, G' devient quasiment constant. Si le comportement de G' n'avait pas encore été décrit dans la littérature, on notera que *Davis & Foegeding (2004)* avaient déjà constaté une augmentation de la « contrainte seuil » en conditions d'écoulement, paramètre rhéologique étroitement lié au G' des mousses, suite à un traitement thermique à température élevée des protéines, mais aussi qu'il avaient décrit l'existence d'un maximum pour ce seuil de contrainte quand 50% de WPI étaient polymérisées, ce qui n'a pas été observé pour G' dans notre cas.

A partir de la littérature (*Bruhn & Bruhn, 1988; Bals & Kulozik, 2003; Raharitsifa, Genovese & Ratti, 2006*), il est déjà bien connu que le taux de foisonnement et la taille moyenne des bulles sont les deux paramètres majeurs qui déterminent la rigidité des mousses protéiques. Dans notre cas, nous avons observé que l'augmentation de la température de traitement thermique des solutions de WPI conduit à la production des mousses présentant à la fois des bulles plus petites, ainsi qu'une rigidité plus élevée (Figure III.30.). Plus généralement, nous avons déjà rapporté que pour des mousses sèches, *Princen & Kiss (1986)* et plus récemment *Wildmoser et coll. (2003)* ont montré que le module élastique G' est corrélé avec la tension de surface (σ), la fraction volumique de gaz (ε) et d_{32} par une relation du type $G' \approx \sigma / d_{32} \cdot f(\varepsilon)$ (voir par exemple, Equation III.1.). Notre étude montre que σ (Figure III.13.) et le taux de foisonnement (Figure III.28.) et donc par conséquent ε , sont presque constants, indépendamment du traitement thermique ; le module élastique G' devrait donc varier comme $1/d_{32}$. Dans ce travail, le module de stockage G' a doublé lorsque la température de traitement thermique est supérieure ou égale à 80°C. Toutefois, même si une diminution du diamètre de Sauter a été mesurée lorsque la valeur de G' a augmentée, la variation de d_{32} sur la Figure III.30. ne correspond pas à une diminution d'un facteur 2. Cela peut être en partie expliqué par le fait que si la relation théorique entre G' et d_{32} décrivant la rhéologie des mousses a été vérifiée pour de nombreuses mousses sèches et émulsions concentrées stabilisées par des surfactants, celle-ci est trop simple pour décrire les mousses sèches à base de protéines, comme l'ont déjà fait remarquer précédemment *Pernell et*

coll. (2002), en particulier à cause du fait que les protéines sont en partie présentes sous la forme d'agrégats qui ont une taille qui peut approcher celle du film entre deux bulles.

En se fondant sur ces considérations, nous avons formulé certaines hypothèses possibles pour expliquer le comportement inhabituel des mousses protéiques. Tout d'abord, la répartition du liquide dans les mousses protéiques pourrait également jouer un rôle essentiel sur la texture de la mousse, comme *Wilde & Clark (1996)* l'ont déjà fait remarquer. Nous pouvons également supposer que la fermeté des mousses protéiques est reliée à la manière dont les bulles et les agrégats sont connectés. Cela pourrait modifier considérablement la rigidité interfaciale des films protéiques, ce qui est en accord avec les données présentées par *Davis & Foegeding (2004)*. Ces auteurs ont suggéré que le seuil de contrainte des mousses de WPI obtenues par battage, qui est lié quantitativement à G' , est significativement influencé par l'élasticité interfaciale des films protéiques. Ils ont ainsi démontré que le module d'élasticité interfaciale en dilatation mesuré dans des conditions dynamiques et le seuil de contrainte en conditions d'écoulement suivent le même comportement parabolique lorsque la teneur en WPI polymérisés augmente, avec un maximum vers 50% de WPI polymérisées. Il est donc maintenant clair que la modification de la quantité de protéines polymérisées à l'interface due à l'effet du traitement thermique ne peut pas être prise en compte par la relation $G' \approx \sigma / d_{32} \cdot f(\varepsilon)$ puisque nous avons démontré que la valeur de la tension de surface est quantitativement assez peu sensible à l'agrégation des WPI.

Toutefois, il faut aussi retenir que contrairement à *Davis & Foegeding (2004)*, nous n'avons pas trouvé dans notre étude un optimum de teneur en agrégats solubles entre 10% w/w et 71% w/w de protéines polymérisées. Une des raisons possibles est que, dans ce travail, nous avons utilisé un traitement thermique en dynamique, contrairement à *Davis & Foegeding (2004)*, ce qui pourrait avoir modifié considérablement le rapport entre les teneurs respectives en agrégats protéiques solubles et insolubles.

Stabilité des mousses

Dans cette section, nous avons étudié la stabilité contre le drainage des mousses préparées à partir des solutions natives et traitées thermiquement. Le traitement thermique des solutions de WPI à 80°C et à 90°C a augmenté la valeur du temps de 1^{ère} goutte drainée des mousses et il semble que pour ces deux températures de traitement, le drainage commence en même temps (Figure

III.31a.). En revanche, le temps de 1^{ère} goutte drainée chute lorsque les protéines sont chauffées à 100°C et il présente alors une valeur qui devient même plus faible que celle observée pour les protéines natives.

Concernant la stabilité à long terme, la cinétique de drainage semble être plus lente dans le cas des mousses préparées à partir de la solution chauffée à 80°C (Figure III.31b.). En effet, dans le cas de celle à base de WPI chauffées à 80°C, la mousse tient plus longtemps (Figure III.31b.), alors que dans le cas des protéines chauffées à 90°C et à 100°C, la totalité de la mousse a été drainée à la fin du cycle de drainage. A des températures de traitement thermique supérieures à 80°C, des chutes brutales de « blocs » de mousse ont été observées par intermittence et l'effondrement de la mousse se produit plus tôt que pour les WPI natives, notre référence. L'exemple le plus frappant a été observé dans le cas de la mousse à base de WPI chauffées à 100°C. Cette mousse a drainé plus vite que toutes les autres mousses étudiées et des chutes brutales et massives de blocs cohérents de mousse ont été enregistrées sur toute la durée de la cinétique de drainage. Lorsque l'on compare la stabilité à court terme des mousses estimée par le temps de première goutte drainée et la stabilité à long terme par l'intermédiaire de la cinétique de drainage, nous pouvons clairement observer que les mousses à base de protéines natives/traitées à 70°C et voire 80°C sont plus stables à long terme, alors que les mousses préparées à base de WPI traitées à 90°C s'avèrent plus stables à court terme, mais que cette meilleure stabilité à court terme est rapidement suivie par une déstabilisation soudaine, ce qui met en évidence le rôle ambivalent du traitement thermique.

Bien que pour les solutions de β -Lg traitées en statique, *Leman & Dolgan (2004)* aient affirmé que l'augmentation de la température de chauffage de 80°C à 90°C a conduit à une amélioration de la stabilité de la mousse, nous avons trouvé dans notre travail qu'il existe une température optimale de chauffage vers 80°C qui améliore la stabilité de la mousse, et qu'au-delà de cette température, la stabilité de la mousse diminue. Ce phénomène débute par une diminution de la stabilité à long terme à 90°C et il s'accompagne de la diminution de la stabilité à court terme à 100°C.

A partir du Tableau III.2. (p. 119) et la Figure III.31., nous avons pu montrer que la stabilité de la mousse est largement affectée par le traitement thermique, mais également que la fraction insoluble des agrégats ne joue qu'un rôle secondaire. En effet, la stabilité à court terme a été améliorée lorsque la proportion d'agrégats solubles se situe entre 10% w/w et 50% w/w (voir

Figure III.8. et Figure III.31a.), ce qui vient confirmer les données rapportées par *Zhu et Damodaran (1994)*, ainsi que par *Davis & Foegeding (2004)*. Concernant la stabilité à long terme, un optimum a également été trouvé et il correspond aussi à la mousse préparée à partir de protéines chauffées à 80°C lorsqu'une proportion de 10% w/w d'agrégats solubles a été produite. On retiendra que pour cette mousse, la déstabilisation est même beaucoup plus lente que dans le cas des mousses préparées à partir de solutions de WPI natives ou chauffées à 70°C. De plus, une tendance accrue des mousses à s'effondrer a été observée lorsque la quantité d'agrégats solubles est devenue supérieure à 50% w/w, en particulier pour la mousse obtenue à partir de la solution chauffée à 100°C, i.e. quand plus de 70% w/w d'agrégats solubles ont été formés. Il semblerait que la présence d'une proportion trop élevée d'agrégats solubles puisse provoquer un affaiblissement du réseau interfacial et conduire ainsi à une déstabilisation prématurée de la mousse.

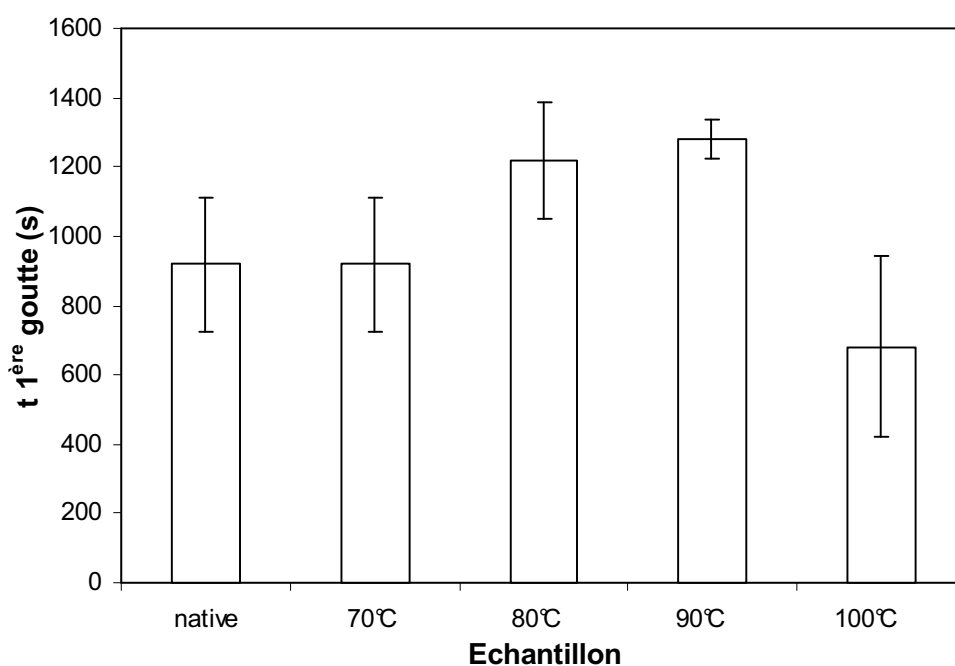


Fig. III.31a. Evolution de la stabilité contre le drainage des mousses protéiques exprimée par le temps de la première goutte drainée.

Finalement, on retiendra qu'une température optimale de dénaturation de 80°C semble être favorable à la formation de mousses à la fois plus stables et plus fermes. Le rôle joué par la présence d'agrégats solubles dans une proportion de 10% en qualité d'agents stabilisants de la

mousse semble être crucial. Ceux-ci sont en effet susceptibles d'interagir entre eux, notamment les agrégats situés sur plusieurs interfaces eau/air adjacentes, ce qui accroît la connectivité de la structure et peut conduire à la formation de « clusters ». La fermeté et la stabilité contre le drainage de nos mousses pourraient donc résulter de la constitution d'un réseau cohésif d'agrégats protéiques solubles aux interfaces et ce, tout le long des films qui séparent chaque bulle au sein de la mousse. La taille de ce type de cluster, sa cohérence et sa rigidité devraient dépendre fortement de la quantité et de la taille des agrégats présents dans la fraction soluble. Cela pourrait expliquer la raison pour laquelle une quantité optimale (environ 10% w/w) d'agrégats solubles a été déterminée et pourquoi, lorsqu'une quantité trop élevée d'agrégats solubles (70% w/w) est présente, des chutes brutales de blocs cohérents de mousse ont été observées. En effet, une surconcentration en agrégats pourrait se traduire par leur coagulation aux interfaces, ce qui formerait de grosses structures cohérentes rigides qui se comporteraient comme des blocs solides, mais qui deviendraient sensibles à la gravité en raison de leur taille au cours des expériences de drainage. La conséquence est que l'augmentation de la stabilité due aux agrégats solubles au sein de ces clusters se traduirait en retour par une fragilité accrue de la structure de la mousse à leurs frontières.

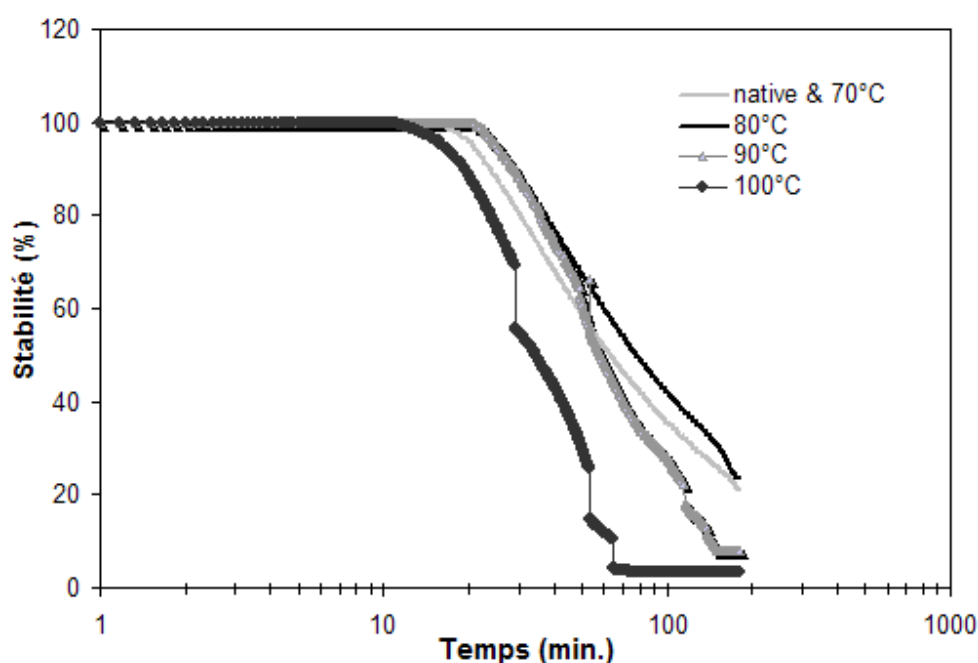


Fig. III.31b. Représentation des cinétiques de drainage des mousses protéiques.

Conclusions

Cette étude expérimentale nous a permis de démontrer que le taux de foisonnement de la mousse est finalement très peu sensible au traitement thermique et que s'il diminue légèrement dans le cas de la solution de WPI traitée thermiquement à 100°C, cela pourrait être expliqué par un début de défaut de protéines solubles non-agrégées pour des taux de foisonnement très élevés, proches de 1000%. Toutefois, un résultat majeur est qu'aucune amélioration du taux de foisonnement n'a pu être obtenue par l'application d'un traitement thermique aux WPI. A contrario, l'élasticité de la mousse, exprimée par son module de stockage (G') a doublé lorsque la température du traitement thermique est supérieure ou égale à 80°C. Cela a confirmé le rôle essentiel des agrégats solubles sur la fermeté et la rigidité des mousses stabilisées par des protéines sériques. De même, le rôle clef des agrégats solubles sur la stabilité des mousses contre le drainage a également été confirmé. Enfin, un résultat essentiel est qu'il existe une proportion optimale d'agrégats solubles (environ 10% w/w), obtenue suite à un traitement thermique à 80°C : en effet, celle-ci permet à la fois de maintenir le taux de foisonnement, de diminuer le diamètre moyen des bulles et d'améliorer simultanément la fermeté et la stabilité des mousses.

II.5. ÉTUDE DÉTAILLÉE DES RÔLES RESPECTIFS DES AGREGATS PROTEIQUES SOLUBLES ET INSOLUBLES SUR LA FORMATION ET LA STABILISATION DES MOUSSES DE WPI

Afin de mieux comprendre l'influence du traitement thermique sur la formation et stabilisation des mousses d'isolats de protéines sériques, nous avons cherché à confirmer le rôle des agrégats protéiques solubles sur la formation et la stabilisation des mousses protéiques, mais aussi à identifier le rôle éventuel de la fraction insoluble. Il s'agissait donc dans un premier temps de mettre au point une méthode capable de distinguer leurs effets respectifs. Cette étude a été conduite sur une solution de 2% w/v WPI à deux concentrations en sel (0 mM et 100 mM NaCl) et à pH 7, solution ayant subi un traitement thermique à 100°C dans un échangeur tubulaire.

Dans ce but, la méthodologie retenue a consisté à séparer préalablement les fractions solubles et insolubles par centrifugation pendant 30 min à 10000g. Ensuite, des mesures de tension de surface, ainsi que des expériences de foisonnement par battage ont été conduites en

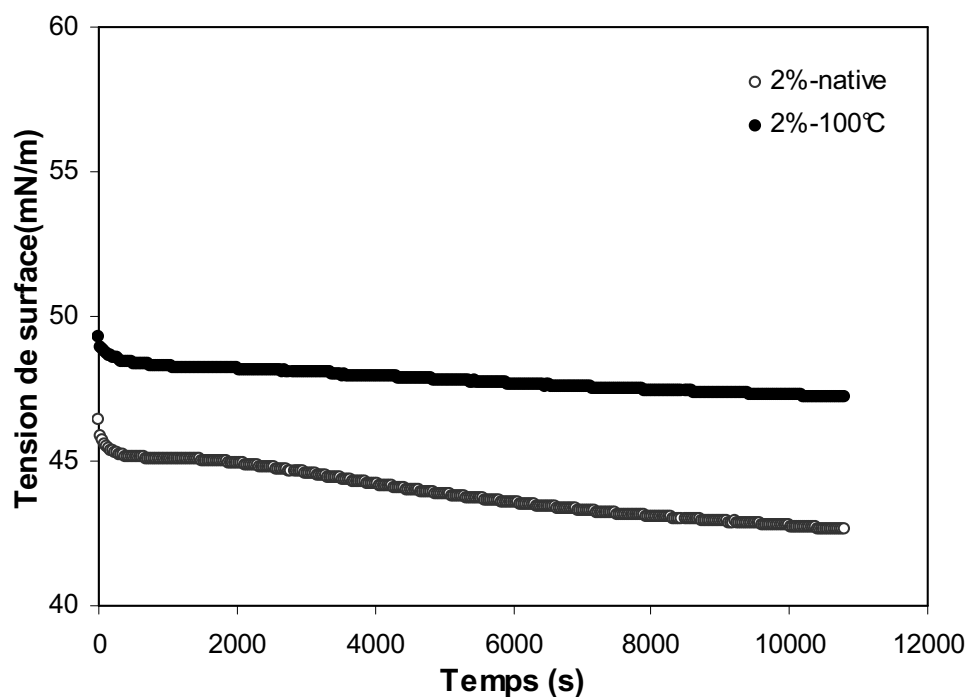
parallèle, à la fois sur des échantillons centrifugés, ce qui élimine la population d'agrégats insolubles présentant une taille supérieure à environ 1 μm , et comme référence, sur les échantillons de solutions de WPI non centrifugés.

Tensiométrie

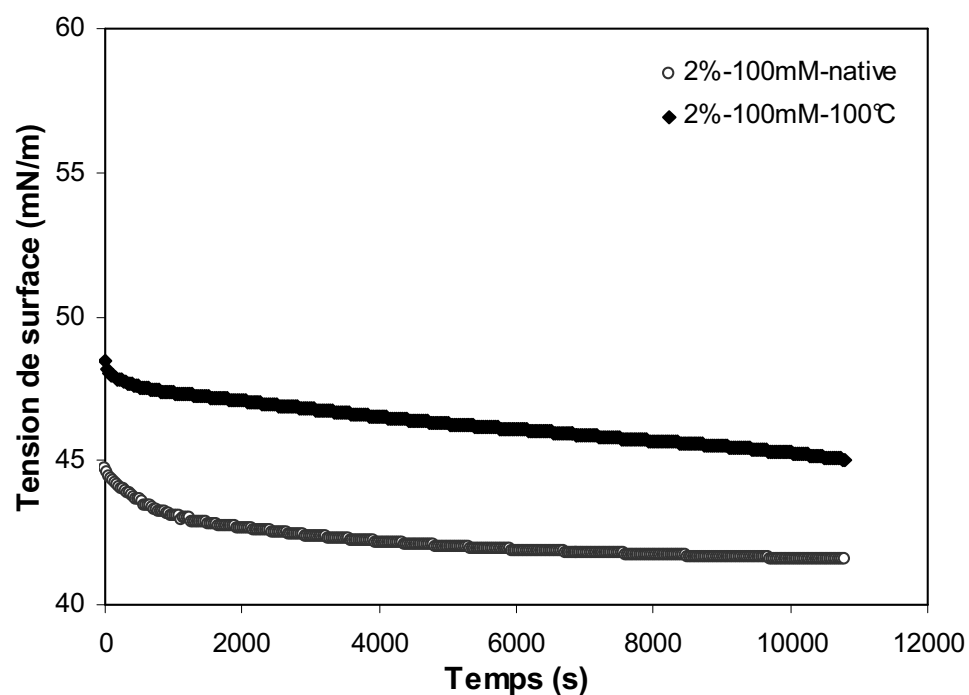
Nous avons déjà vu que l'évolution au cours du temps de la tension de surface (σ) peut permettre de comprendre, au moins en partie, l'évolution de la capacité moussante des solutions de protéines sériques car elle contient toute l'information sur la cinétique d'adsorption des protéines à l'interface gaz-liquide, ce qui illustre partiellement leur comportement au cours du battage.

La Figure III.32. décrit la variation de la tension de surface (σ) des solutions de WPI natives et traitées thermiquement en fonction du temps. A des concentrations aussi élevées en protéines (2% w/v), il existe une incertitude statistique sur les valeurs du σ d'environ ± 1 mN/m (estimée à partir de répétitions). En conséquence, les données expérimentales montrent que les protéines natives présentent toujours une tension de surface plus faible que les solutions de WPI traitées thermiquement, ce qui traduit le fait que l'adsorption est plus rapide pour les protéines non-polymérisées en raison de leur plus grande diffusivité, mais aussi que l'affinité thermodynamique des agrégats protéiques vers l'interface gaz-liquide est réduite.

Par l'intermédiaire de la Figure III.32., nous avons également montré que les valeurs de σ sont similaires, voire même un peu plus faibles pour les solutions contenant du NaCl que pour celles sans sel. Toutefois, la Figure III.32. nous permet d'observer que l'effet du NaCl sur les valeurs du σ reste faible par rapport à l'impact du traitement thermique. Son effet correspond à un écrantage électrostatique dû à l'augmentation de la force ionique qui devrait augmenter à la fois la vitesse et la proportion des protéines adsorbées. Le traitement thermique combiné à l'écrantage réalisé par la force ionique semble compenser en partie l'effet de la proportion croissante de protéines solubles polymérisées qui tendent à augmenter les valeurs de σ , comme indiqué précédemment. Une autre explication tient aussi au fait que la quantité d'agrégats insolubles formés diminue lorsque NaCl est ajouté (Tableau III.1.).



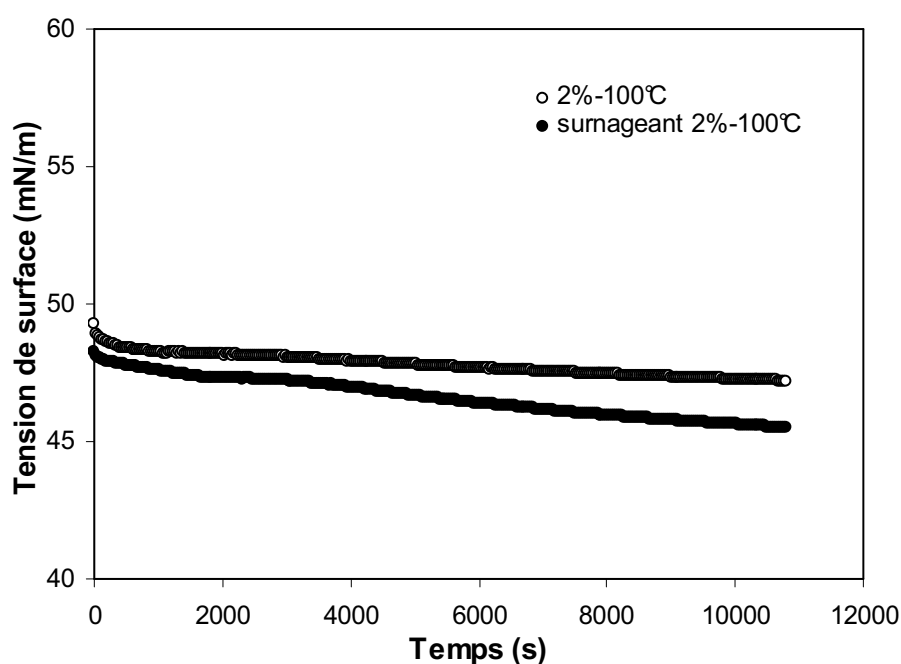
a.



b.

Fig. III.32. Mesures de tension de surface pour les solutions de WPI natives et traitées thermiquement à 100°C.

Le faible rôle des agrégats insolubles sur la tension de surface est confirmé par la caractérisation des surnageants obtenus suite à la centrifugation des solutions de WPI traitées thermiquement (Figure III.33.). Cette figure met en évidence les changements dans l'évolution des courbes de σ entre les solutions traitées thermiquement et leurs surnageants. Une diminution des valeurs de σ pouvait être attendue dans le cas des surnageants, puisque les plus gros agrégats ont été éliminés, mais l'écart entre les courbes est resté faible, surtout après l'ajout de NaCl, ce qui confirme le rôle clef des protéines natives, ainsi que des agrégats solubles sur σ . Ce dernier point est en accord avec les résultats de *Bouaouina et coll. (2005)*, ces chercheurs ont montré qu'en éliminant les gros agrégats par filtration à $0,45\ \mu\text{m}$, la cinétique d'adsorption des protéines devient plus rapide et que la tension de surface atteint des valeurs plus faibles à l'équilibre.



a.

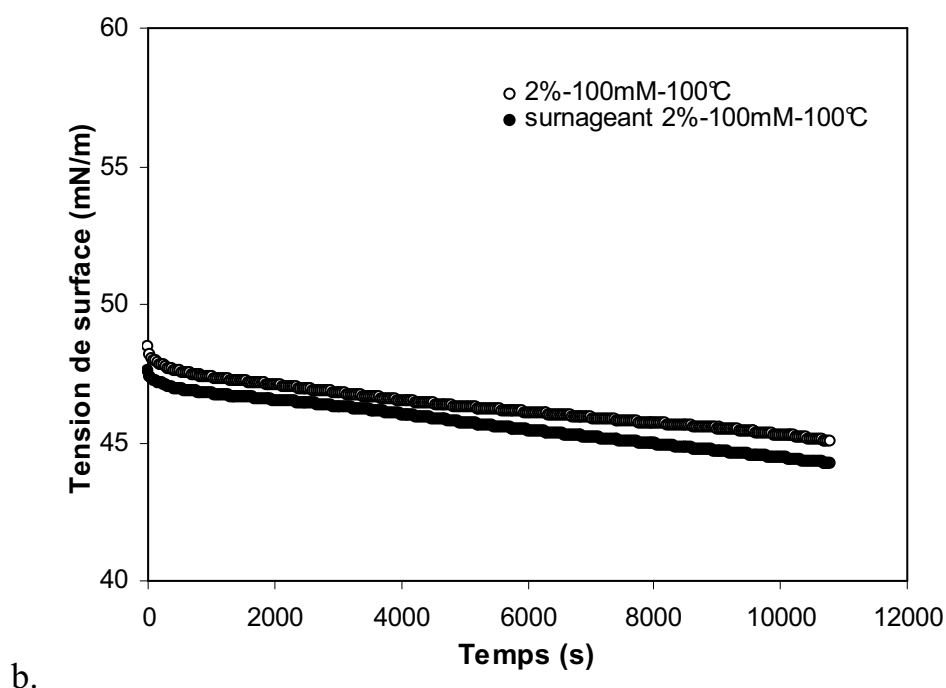


Fig. III.33. Mesures de tension de surface pour les solutions de WPI traitées thermiquement à 100°C : comparatif entre les solutions protéiques et leurs surnageants : a). sans NaCl, b). 100 mM NaCl.

Capacité foisonnante

Les valeurs du taux de foisonnement des surnageants sont reportées sur la Figure III.34. (barres noires) et comparées aux valeurs du taux de foisonnement obtenues à partir des WPI non-centrifugées (barres blanches).

Pour les protéines natives, la Figure III.34. montre que les échantillons centrifugés conduisent à des valeurs de taux de foisonnement plus faibles ; dans ce cas, l'effet de l'ajout de NaCl n'est pas statistiquement significatif. Ce comportement peut être attribué tout d'abord à la réduction de la concentration en protéines dans la solution, suite à la centrifugation, mais également à l'élimination des plus gros agrégats protéiques qui sont formés pendant l'étape d'hydratation des WPI.

Dans le cas des solutions traitées thermiquement, l'élimination de la fraction insoluble conduit à des taux de foisonnement plus élevés et pourrait donc avoir un effet stabilisant sur les bulles. Ainsi, la Figure III.34. démontre tout d'abord le rôle néfaste sur le foisonnement des

agrégats insolubles pour les solutions traitées thermiquement, mais aussi la capacité foisonnante élevée des agrégats protéiques solubles générés par traitement thermique dynamique. En effet, le taux de foisonnement augmente après centrifugation, non seulement par rapport aux solutions traitées non-centrifugées, mais également par rapport aux solutions non traitées thermiquement, et ce malgré la plus faible teneur en protéines des surnageants ; de plus, cette tendance est renforcée par la présence du NaCl puisque la proportion d'agrégats solubles passe de 8% w/w pour les solutions de WPI sans NaCl à 17% w/w pour les solutions de WPI contenant 100 mM NaCl.

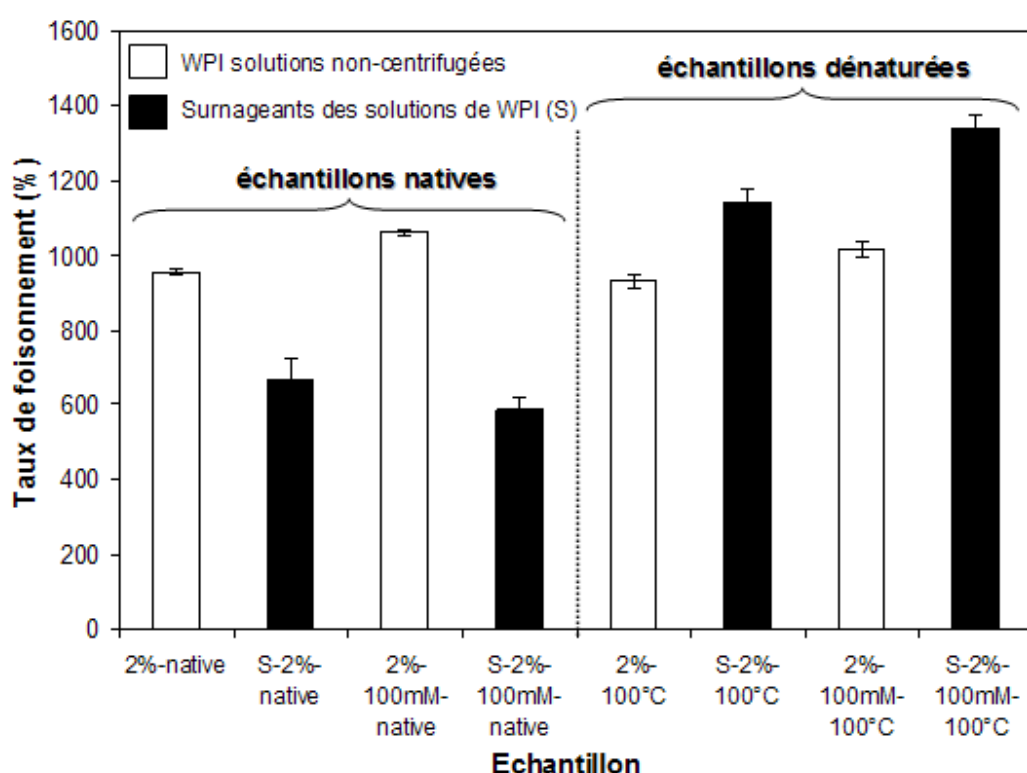


Fig. III.34. Impact de la fraction insoluble sur le taux de foisonnement pour les WPI natives et les WPI traités thermiquement ainsi que de leurs surnageants (S).

En conclusion, le traitement thermique dynamique semble former deux types d'agrégats protéiques : des gros agrégats insolubles qui ont clairement le rôle d'anti-mousse et des agrégats solubles qui sont des agents moussants très efficaces. Il en résulte que l'optimisation du traitement thermique dynamique couplé à celle de la force ionique est susceptible d'améliorer les propriétés foisonnantes des protéines sériques si l'on est capable d'augmenter la fraction

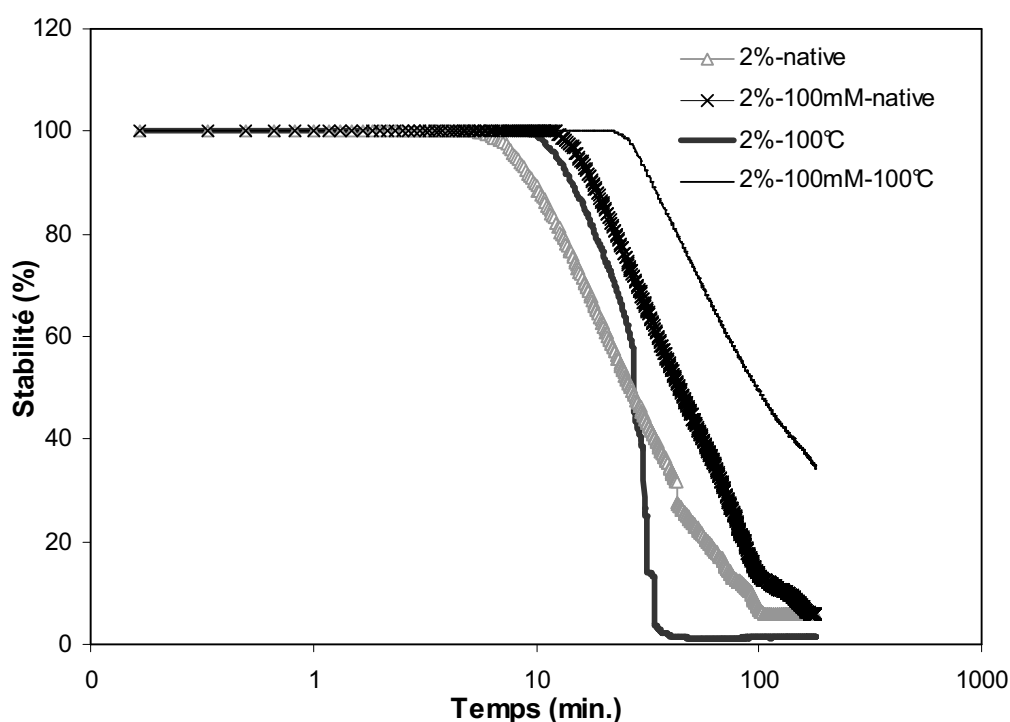
d'agrégats solubles sans accroître celle des agrégats insolubles. Toutefois, la détermination des conditions optimales est loin d'être évidente puisqu'en plus du traitement thermique et de la force ionique, il faut tenir compte d'un troisième paramètre que nous n'avons pas encore étudié : la teneur en protéines de la solution.

Stabilité des mousses

Les protéines sériques agrégées sont connues pour avoir une plus grande capacité de rétention de l'eau que les protéines natives (Dannenberg, 1986; Spiegel, 1999). Selon Leman & Dolgan (2004), une faible dénaturation des WPI par chauffage favorise la formation des molécules de β -Lg dépolymérisées et dépliées qui peuvent diffuser et s'adsorber rapidement afin de former un film interfacial épais par replissement à l'interface. En conséquence, un film viscoélastique formé à l'interface devrait prévenir le drainage du liquide et augmenter la stabilité contre le drainage des mousses. Toutefois, la littérature montre aussi qu'une déplétion des protéines capables à s'adsorber à l'interface air-eau est possible, soit en raison de la présence d'agrégats trop gros, soit suite à une dénaturation trop sévère des protéines qui provoque une perte de structure secondaire et peut entraîner la formation d'un film interfacial insuffisamment épais caractérisé par une faible élasticité interfaciale. Cela a pour conséquence de réduire la stabilité des mousses, mais aussi la résistance au cisaillement des interfaces au cours de la formation de la mousse, ce qui peut conduire à des bulles plus grosses. Par exemple, Leman & Dolgan (2004) ont affirmé qu'en chauffant des WPC à 70°C pendant 1 min., les propriétés foisonnantes ont été améliorées, alors qu'un chauffage plus sévère (70°C ou 90°C pendant 5 min. ou plus) a diminué les propriétés moussantes des WPC. De même, Zhu & Damodaran (1994) ont décrit l'existence d'un maximum de stabilité de la mousse lorsque 60% des protéines sériques ont été dénaturées, mais pour des traitements thermiques statiques. Leurs résultats contredisent toutefois les données expérimentales obtenues par Davis & Foegeding (2004) dans une étude menée sur la β -Lg ; ces auteurs ont mis en évidence une amélioration continue de la stabilité des mousses avec l'augmentation du niveau de dénaturation des protéines, mais ceci s'explique probablement par le fait qu'ils ont utilisé une concentration très élevée en protéines en solution (10% w/v).

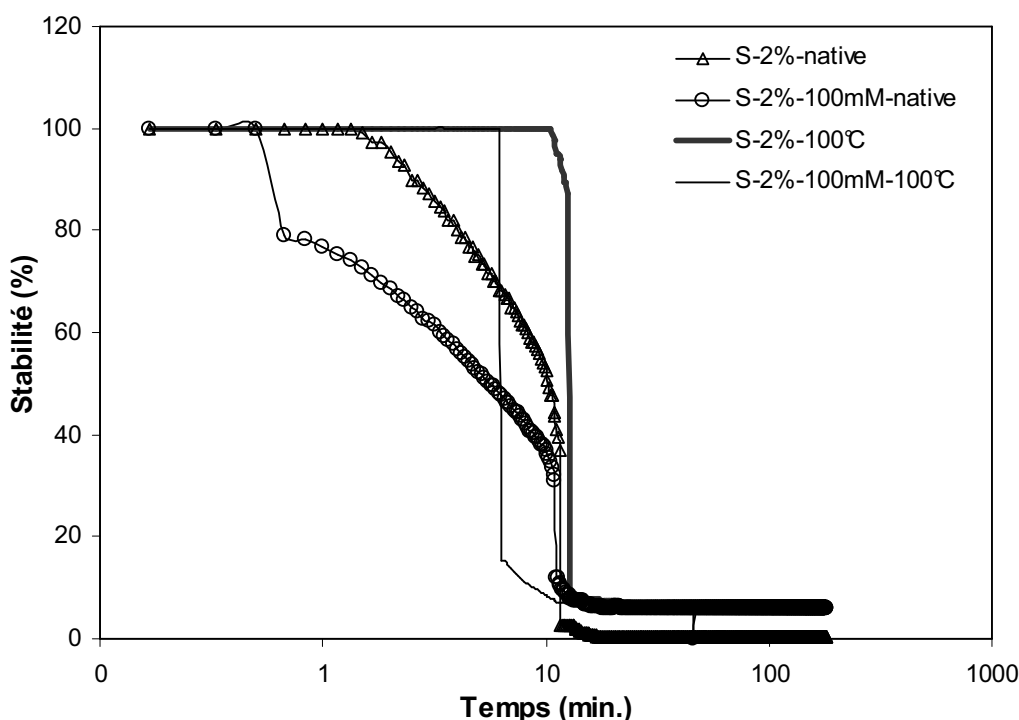
Dans ce travail, la Figure III.35. présente non seulement les quatre courbes de drainage obtenues pour des mousses à base de WPI, soit natives, soit traitées thermiquement, en l'absence

ou bien en présence de NaCl (Figure III.35.a), mais aussi les mêmes courbes pour des mousses préparées à partir de leurs fractions solubles obtenues par centrifugation, c'est-à-dire à partir des surnageants (Figure III.35.b). En analysant ces figures, on constate que le drainage se déroule en deux étapes. Initialement, la phase liquide coule librement sous l'effet de la gravité, même si l'écoulement est retardé (i.e. ou le débit est réduit) par le gradient de la tension de surface. Dans un second temps, le liquide drainé résulte de l'effondrement des mousses sèches dans lesquelles le disproportionnement et la coalescence jouent un rôle clef (*German, O'Neill & Kinsella, 1985*). L'effondrement de la mousse peut alors être évité seulement lorsque les bords du Plateau des mousses sèches sont stabilisés (par exemple, pour la formulation à 100°C-100 mM NaCl sur la Figure III.35.a) ; en revanche, il survient rapidement lorsqu'une stabilisation incomplète des interfaces et des distributions des tailles des bulles assez larges sont observées simultanément (voir par exemple, la formulation à 100°C sur la Figure III.35.a).



a.

Fig. III.35a. Courbes de drainage des mousses générées à base de solutions protéiques non-centrifugées.



b.

Fig. III.35b. Courbes de drainage des mousses générées à base de solutions protéiques centrifugées (surnageants).

De plus, la Figure III.35.a peut être analysée du point de vue du temps de 1^{ère} goutte drainée. Nous avons observé que l'ajout de NaCl et l'application du traitement thermique augmentent le temps de 1^{ère} goutte drainée. Ce paramètre est multiplié par un facteur proche de 3 lorsque le sel et le traitement thermique dynamique sont combinés. De plus, la stabilité à long terme des mousses présente les mêmes tendances que le temps de 1^{ère} goutte sur la Figure III.35.a, à l'exception des formulations de force ionique faible : les mousses préparées à partir de WPI dénaturées sans NaCl s'effondrent au bout de 30 min., ce qui n'a pas été observé même pour les protéines natives sans sel. Ainsi, pour les mousses formées à base d'échantillons non-centrifugés nous avons observé que l'effondrement arrive surtout lorsque la solution de WPI a été complètement dénaturée avec formation de la plus élevée proportion de gros agrégats insolubles (2%-100°C).

L'analyse de la stabilité de la mousse pour les surnageants (Figure III.35.b) confirme le rôle positif des agrégats solubles. Pour les surnageants, l'analyse de la Figure III.35.b. est toutefois plus complexe parce que les mousses présentent de grandes différences au niveau du

taux de foisonnement atteint (Figure III.34.), ce qui n'était pas le cas pour les solutions non centrifugées. En effet, le temps de 1^{ère} goutte semble être corrélé au taux de foisonnement : lorsque TF se situe entre 500% et 600% (c'est-à-dire dans le cas des mousses préparées à base de protéines natives), le drainage gravitationnel l'emporte et commence immédiatement à cause de l'humidité élevée de ces mousses ; dans le cas des mousses obtenues à partir de WPI dénaturées avec des taux de foisonnement élevés (Figure III.34.), la présence des agrégats solubles dans les surnageants et la quantité de gaz qu'ils stabilisent augmentent le temps de 1^{ère} goutte en retardant la déstabilisation de la mousse. Contrairement à la Figure III.35.a., le temps de 1^{ère} goutte le plus élevé après centrifugation sur la Figure III.35.b. correspond aux WPI qui ont subi une dénaturation complète (c'est-à-dire sans NaCl). Cela met à nouveau en évidence l'effet négatif des agrégats insolubles sur la stabilité de la mousse obtenue sur la même solution, mais non-centrifugée (Figure III.35.a.).

Toutefois, lorsque nous avons comparé les deux Figures III.35.a. et III.35.b., nous avons observé une contradiction dans le rôle de la fraction insoluble dans la stabilité des mousses protéiques. En effet, la stabilité diminue considérablement dans le cas des mousses produites à partir des échantillons centrifugés. Par exemple, dans le cas de la formulation à 2%-100mM-100°C, le temps de la 1^{ère} goutte passe de 24 *min.* pour la mousse produite à partir d'une solution de WPI non-centrifugée à 6 *min.* pour une mousse générée à base de surnageant. Par conséquent, cette partie de notre étude mériterait qu'on lui accorde une attention particulière à l'avenir ; une perspective intéressante consisterait en une étude sur le foamsan.

L'analyse par SEC de la fraction drainée avant l'effondrement des mousses a montré que 17% w/w de protéines sériques ont été agrégées dans la fraction drainée (Fig. III.35.c.), tandis que les agrégats ne représentaient que 8% w/w dans les solutions avant la formation de la mousse (Tableau III.1.). Par conséquent, les agrégats ont drainé plus rapidement que les autres fractions protéiques lorsque le montant des agrégats insolubles était élevé. Il n'est toutefois pas clair si cela est le résultat de leur faible diffusivité en raison de leur taille ou leur faible affinité pour les interfaces gaz-liquide démontré par leur tension de surface supérieure, mais cela explique pourquoi les mousses obtenues avec de protéines sériques à faible force ionique après traitement thermique vont s'effondrer rapidement. Au contraire, quand seulement 10% de protéines sériques ont été dénaturées par traitement thermique (c'est-à-dire en présence de 100 mM NaCl), la

stabilité de la mousse a augmenté radicalement (Fig. III.35.a.) Ce comportement démontre que les agrégats solubles sont fortement liés aux interfaces eau-air et qu'ils jouent un rôle stabilisateur dans les mousses lorsque la fraction insoluble présente est faible, alors que les agrégats insolubles favorisent le drainage des protéines et l'effondrement des mousses de WPI. Des résultats expérimentaux sur la stabilité des mousses peuvent être également expliqués sur la base de l'effet de la force ionique qui vient stabiliser les interfaces en augmentant la proportion en protéines adsorbées, mais aussi qui va limiter la dénaturation des protéines pour les échantillons traités thermiquement.

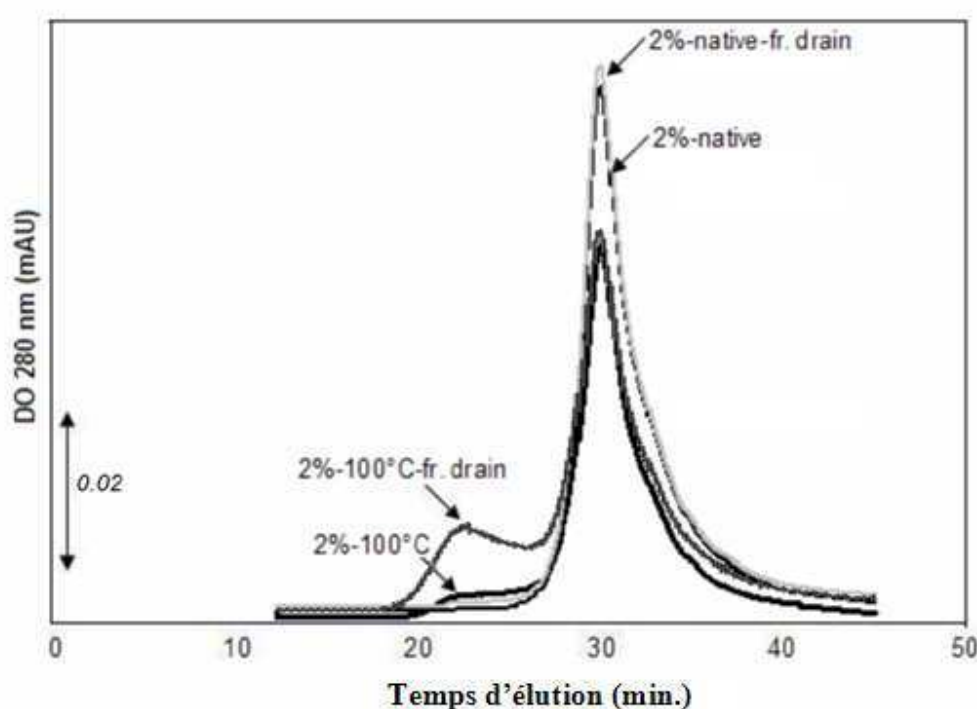


Fig. III.35c. Courbes d'élution des solutions natives et traitées thermiquement: comparatif avec les fractions drainées obtenues après battage.

Conclusions

Les résultats obtenus suite à cette étude confirment que la taille des agrégats joue un rôle majeur sur la formation et la stabilité des mousses de WPI. Par rapport à ce qui avait été obtenu précédemment, nous avons démontré en plus que la fraction protéique insoluble (c'est-à-dire les agrégats de tailles supérieures à 1 μm) a un effet néfaste à la fois sur la formation et sur la

stabilité de la mousse. Par exemple, les agrégats insolubles favorisent un démarrage plus rapide du drainage que les autres fractions protéiques. A contrario, nos données expérimentales ont confirmé les résultats précédents sur les agrégats solubles (dont la taille est voisine de 200 nm) : leur présence conduit à des mousses qui drainent plus lentement. De plus, nos données montrent clairement que les agrégats solubles ont un effet positif non seulement sur la stabilisation des mousses de WPI, mais aussi sur leur formation, ce dernier ayant été caché au cours des études précédentes par l'effet néfaste des agrégats insolubles qui se forment simultanément au cours du traitement thermique.

II.6. IMPACT D'UN TRAITEMENT THERMIQUE SEVERE DE TYPE « POST-TRAITEMENT » SUR LES PROPRIETES DES MOUSSES DE WPI

Selon le degré de dénaturation des protéines, ainsi que la nature de la nouvelle structure protéique qui en résulte, les mousses de WPI présentent des différences significatives, que ce soit au niveau du taux de foisonnement, de l'aire interfaciale, de leur résistance mécanique et de leur élasticité, ainsi que de leur capacité de rétention d'eau (Leman & Dolgan, 2004). Les transitions moléculaires des protéines natives vers les états dénaturés impliquent des changements conformationnels des structures secondaires, tertiaires et quaternaires, ainsi que des échanges entre différents types de liaisons, telles que les ponts hydrogène, les interactions hydrophobes, les liaisons électrostatiques et les ponts disulfures. Ce sont ces changements qui déterminent la structure finale des mousses, ainsi que leur texture (Ker & Toledo, 1992). Afin de favoriser les interactions hydrophobes, et l'échange des ponts disulfure au sein de notre solution, l'application d'un post-traitement thermique aux solutions protéiques dénaturées à une température de 100°C peut être envisagée.

Dans cette section, l'influence d'un post-traitement thermique a été étudiée. Toutefois, le choix s'est porté sur des solutions protéiques à 3% w/v WPI. En effet, une comparaison entre la Figure III.36. et la Figure III.28. montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les taux de foisonnement des mousses obtenues à partir de solutions protéiques à 2% et 3% w/v, aussi bien pour les natives que les dénaturées à 100°C. S'il y a peu d'espoir d'améliorer les propriétés des mousses par un post-traitement thermique pour une concentration de 2%, la littérature déjà citée a montré que cela était possible, tout du moins en statique, aux concentrations protéiques

plus élevées. Par la suite, nous étudierons donc l'impact du post-traitement thermique (durée comprise entre 15 min. et 4h) sur le taux de foisonnement, la stabilité et la texture des mousses en utilisant une solution protéique à 3% w/v.

Tout d'abord, la capacité foisonnante des solutions de WPI natives ou dénaturées par chauffage a été étudiée. Les résultats expérimentaux, représentés sur la Figure III.36., montrent clairement que lorsque l'on applique un post-traitement thermique (maintien à 80°C pour différentes durées), le taux de foisonnement des mousses protéiques ne présente pas d'amélioration significative : tous les échantillons dénaturés, quelle que soit la durée du post-traitement, présentent un taux de foisonnement qui oscille autour de 900%, soit moins que pour la solution native. En conclusion, l'effet du traitement thermique à 100°C a un effet similaire sur des solutions de WPI à 2% et 3% w/v, sans qu'il soit modifié par le post-traitement : il réduit le taux de foisonnement.

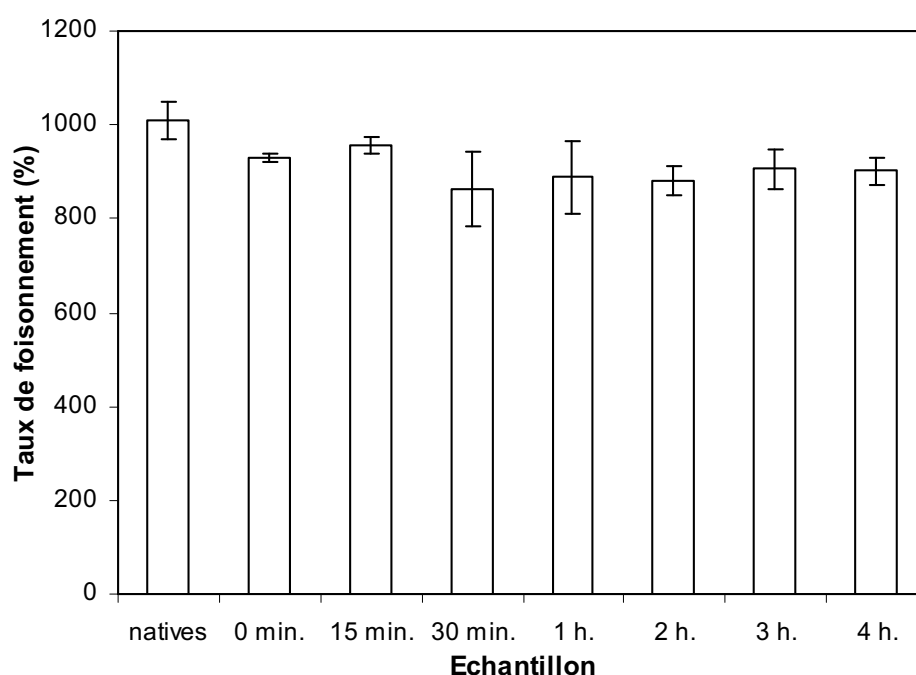


Fig. III.36. Influence de la durée de post-traitement thermique sur le taux de foisonnement des mousses.

Dans notre étude, nous avons également comparé la stabilité contre le drainage des mousses préparées à partir des solutions natives et traitées thermiquement, sans et avec post-

traitement thermique (Figure III.37.). A partir de ces résultats, nous avons pu observer une amélioration significative de la stabilité contre le drainage (temps de 1^{ère} goutte drainée) pour la mousse préparée à partir d'une solution traitée à 100°C (sans post-traitement) par rapport aux mousses obtenues à partir des solutions natives ou bien des solutions post-traitées thermiquement. En revanche, nous avons remarqué un écart assez important entre la mousse obtenue à partir de WPI traitées à 100°C sans post-traitement et celle générée à partir de WPI post-traitée pendant une durée de 30 min. En effet, un maintien des solutions de WPI à chaud pendant 30 minutes à une température de 80°C s'avère fortement défavorable à la stabilité de la mousse. La conclusion est que l'application d'un traitement thermique à 100°C se montre très intéressant et on peut dire même que ceci constitue un optimum, mais qu'à nouveau, dépasser cet optimum se traduit par une forte diminution de la stabilité des mousses.

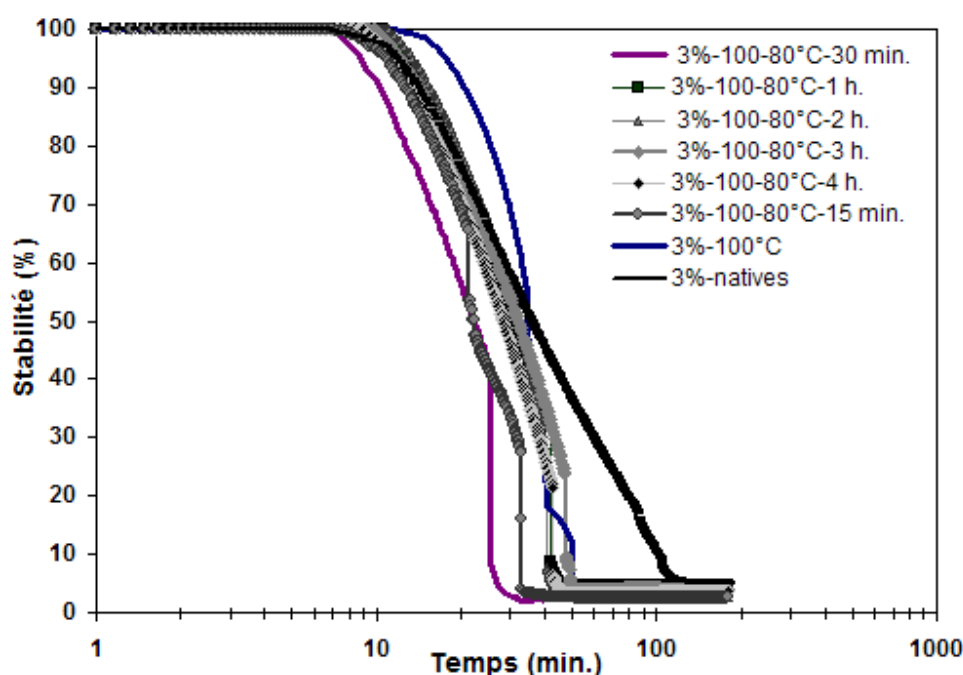


Fig. III.37. Influence de la durée de post-traitement thermique sur la stabilité des mousses.

Enfin, dans la dernière partie de cette étude, la texture de la mousse a été estimée, à nouveau par l'intermédiaire du module élastique G' , au cours d'un balayage en temps. Tout d'abord, nous avons trouvé que G' est fortement influencé par le traitement thermique et également par la durée du post-traitement, comme ceci apparaît clairement sur la Figure III.38.

En effet, l'élasticité de la mousse augmente fortement pour l'échantillon traité par la chaleur à une température de 100°C, mais en revanche, le post-traitement influence d'une manière négative la fermeté de la mousse, ce qui est en accord avec les résultats de drainage, comme précédemment pour les solutions à 2% de protéines. Ce résultat confirme aussi les conclusions issues des mesures de taux de foisonnement sur le couplage entre l'optimum de la température de traitement et la teneur en protéines de la solution dans cette section.

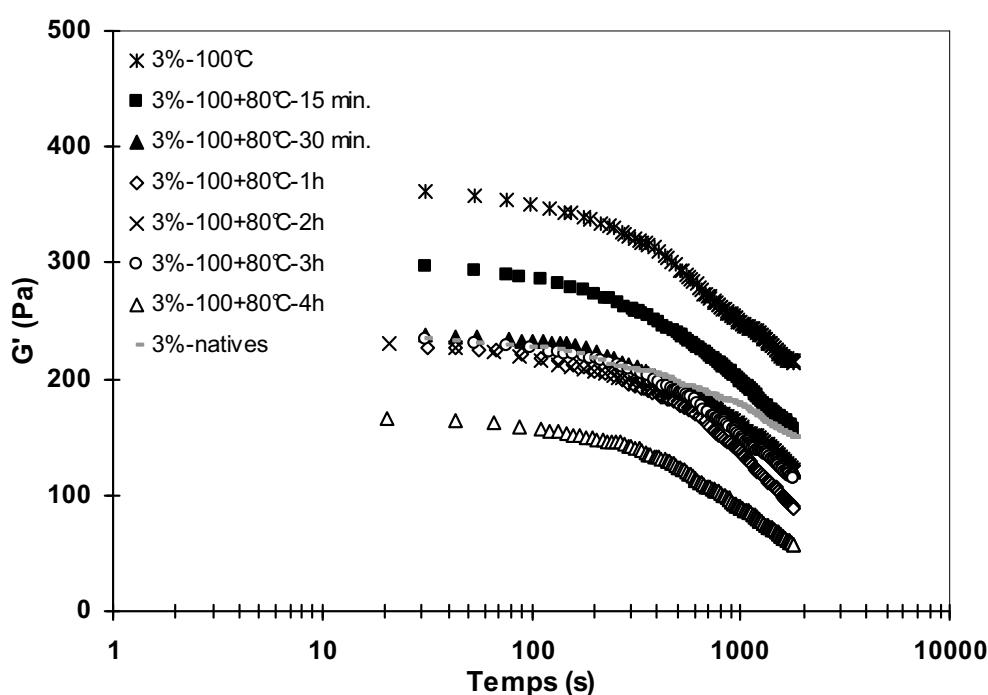


Fig. III.38. Influence de la durée de post-traitement thermique sur la texture des mousses : étude dynamique en fonction du temps.

En conclusion, appliquer un traitement thermique sévère aux solutions protéiques (température élevée de traitement par chaleur suivi d'une durée prolongée de temps de post-traitement) nuit aux propriétés physico-chimiques des mousses.

III. CARACTERISATION DES MOUSSES PROTEIQUES PRODUITES EN CONTINU – *SYSTEME ROTOR-STATOR*

Dans ce troisième sous-chapitre, nous présenterons les résultats expérimentaux obtenus lors du foisonnement en continu des solutions protéiques dans l'installation de type rotor-stator. L'objectif de cette étude est de trouver un couple formulation/conditions opératoires optimal, avec une formulation comprenant des agrégats protéiques et avec des conditions opératoires qui permettent en les combinant de stabiliser des mousses alimentaires en l'absence de matière grasse afin de produire des produits foisonnés satisfaisants du point de vue de la texture et de la durée de vie. Les conditions opératoires étudiées sur l'unité rotor-stator ont été les suivantes :

- *la vitesse du rotor N* (entre 400 et 1600 tpm) ;
- *la pression de fonctionnement* (contrôlée grâce à une vanne de contre-pression sur la sortie du foisonneur, entre 0 et 2 bars relatifs) ;
- *le temps de séjour* (par l'intermédiaire des débits) ; les expériences ont été réalisées à rapport de débits volumiques de gaz et de liquide fixé, $G/L=2$, G et L étant exprimés en mL/min, ce qui correspond à un taux de foisonnement maximal qui peut être atteint de 200% en régime permanent. Deux temps de séjour ont été étudiés ; nous les appellerons pour simplifier « long » ($G=30$ mL/min) et « court » ($G=90$ mL/min).

A titre d'information, la composition des solutions employées dans le cadre de ce travail est détaillée ci-dessous :

- 3% de protéines sériques ;
- 50 mM de NaCl pour ajuster la force ionique ;
- 15 % de sucre ;
- 0,35 % de xanthane (nécessité d'ajouter du xanthane car le TF est plus bas et la mousse trop humide).

Pour comprendre l'effet des agrégats protéiques sur les performances de l'opération et sur les propriétés des mousses, des traitements thermiques dans un échangeur à plaques ont été appliqués

respectivement à 70, 80 et 90°C à cette solution en amont du foisonnement en se plaçant dans les conditions thermiques les plus proches de celles de l'échangeur tubulaire pour amener les agrégats protéiques dans un état comparable. Les résultats pouvant alors être confrontés à ceux obtenus avec la solution contenant des protéines natives (voir Tableau III.9.).

Tableau III.9. Propriétés des solutions de WPI (3% w/v) natives et traitées entre 70–90°C.

<i>Solution</i>	<i>Degré de dénaturation par DSC (%)</i>	<i>Agrégats dans la fraction soluble par SEC (% w/w)</i>	<i>Diamètre moyen par DLS (nm)</i>	<i>Agrégats insolubles par centrifugation (% w/w)</i>
native	-	-	122,5	1,1
70°C	47	8	122	2,1
80°C	97	15	107	8,8
90°C	98	12	78,8	8,4

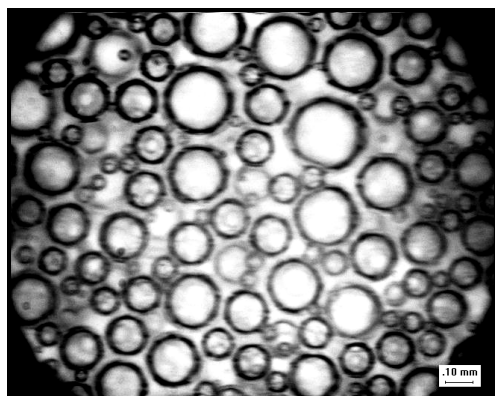
Le degré de dénaturation obtenu est un peu plus poussé qu'avec l'échangeur tubulaire (Tableau III.2., p. 119) ; nous vérifierons si le traitement thermique entraîne les mêmes effets sur les propriétés des mousses que lors des opérations en batch.

Dans ce but, nous analyserons à la fois les effets du traitement thermique et des conditions opératoires du foisonnement, simultanément sur le taux de foisonnement (TF), la distribution de taille des bulles et le diamètre de Sauter (d_{32}), la texture des mousses, ainsi que leur stabilité dans le temps, à court terme (liquide drainé) et à long terme (effondrement du squelette de la mousse).

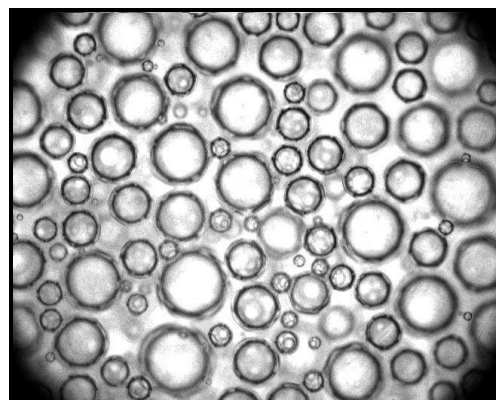
III.1. MICROSTRUCTURE DES MOUSSES

III.1.1. Impact du traitement thermique

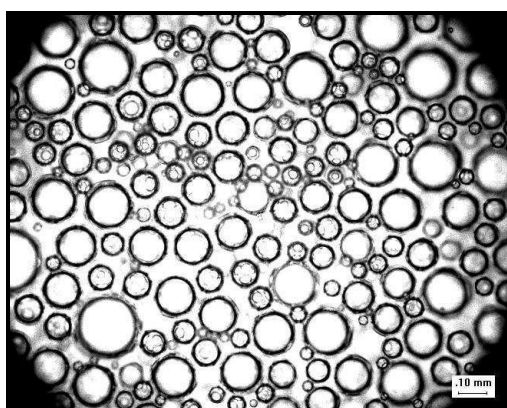
Du point de vue du taux de foisonnement, le traitement thermique ne modifie pas les résultats obtenus lors du foisonnement en continu. Ceux-ci seront détaillées par la suite, lors de l'analyse de l'effet des conditions opératoires et nous nous contenterons ici de signaler que lorsque les conditions opératoires permettent une incorporation totale du gaz, celle-ci est atteinte avec ou sans traitement thermique et qu'il en va de même lorsque ces conditions conduisent au pistonnage. L'effet du traitement thermique est en revanche bien plus marqué lorsque l'on s'intéresse aux distributions de tailles des bulles.



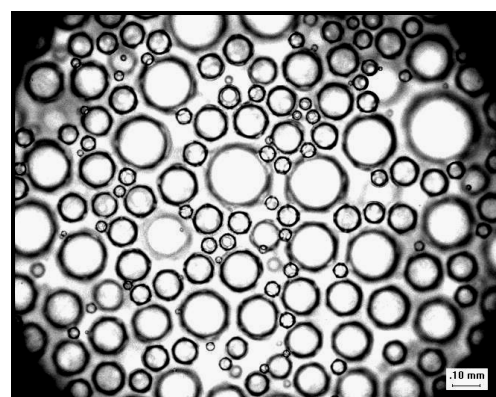
$d_{32}=167 \mu\text{m}$ (3%-native-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=152 \mu\text{m}$ (3%-70°C-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=143 \mu\text{m}$ (3%-80°C-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=145 \mu\text{m}$ (3%-90°C-atmosphérique-30L/60G)

Fig. III.39. Evolution de la taille des bulles dans la mousse (N=1600 tpm) en fonction du traitement thermique.

Nous illustrerons ce résultat en examinant les images des bulles dans des mousses formées au temps de séjour le plus long et à 1600 tpm pour lesquelles une incorporation totale du gaz a toujours été atteinte (Figure III.39.). Dans ce cas particulier qui illustre parfaitement le comportement général, nous avons observé une diminution significative de la valeur du diamètre de Sauter lorsque le foisonnement a été conduit sur des solutions protéiques dénaturées par la chaleur, plus particulièrement pour les solutions dénaturées à 80°C et 90°C. En effet, lorsque l'on compare les diamètres de Sauter des mousses obtenues lors du foisonnement des solutions dénaturées à 80°C et les d_{32} des mousses produites lors du foisonnement des solutions natives, on observe que les bulles sont nettement plus petites (avec une diminution d'environ 24 μm). Ceci pourrait jouer un rôle clef sur la texture et la stabilité de la mousse (Equation III.1.). On peut également noter que les résultats obtenus sur l'unité rotor-stator sont en accord avec ceux obtenus

précédemment sur le batteur ménager : les deux vont dans le sens où le traitement thermique des solutions de WPI conduit à une diminution du d_{32} . En ce qui concerne la distribution des tailles de bulles dans la mousse (Figure III.40), celle-ci se montre polydisperse pour les mousses obtenues à partir de WPI natives et elle reste polydisperse, mais légèrement moins large dans le cas des mousses produites à partir de solutions traitées thermiquement.

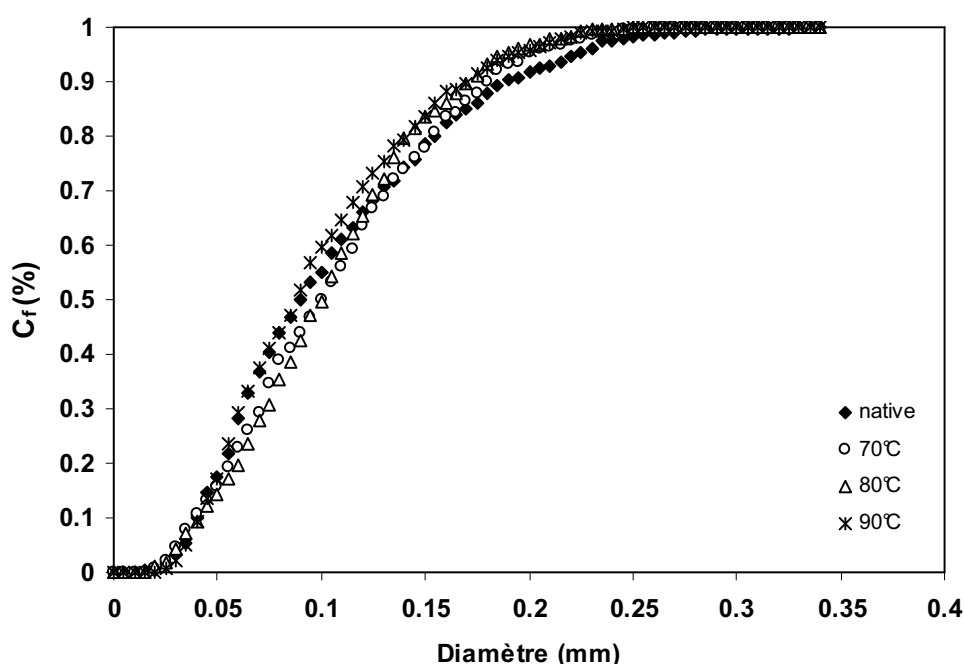


Fig. III.40. Effet du traitement thermique sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (à 1600 tpm, 30L/60G, pression atmosphérique).

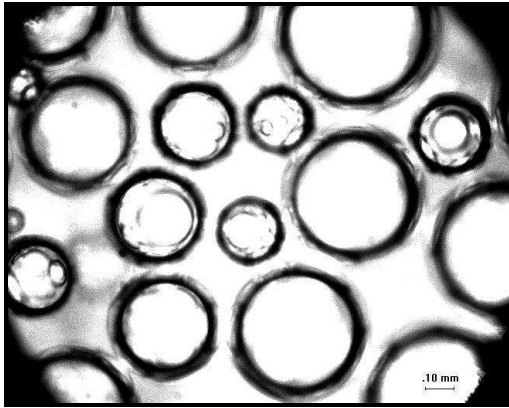
En conclusion, nos résultats expérimentaux (Figure III.39. et Figure III.40) nous permettent d'affirmer que malgré le traitement thermique, le taux de foisonnement cible peut toujours être atteint à conditions opératoires identiques lorsqu'il est atteint préalablement avec les protéines natives. Dans tous les cas étudiés, les mousses formées présentent une distribution des tailles de bulles polydisperse, constituée de grosses bulles qui représentent l'essentiel du volume de gaz, même en présence d'agrégats protéiques formés par traitement thermique entre 70°C et 90°C. Le traitement thermique a pour conséquence une diminution nette de d_{32} dès qu'une température supérieure ou égale à 80°C est appliquée, mais il faut mentionner qu'un traitement à plus que

80°C ne permet pas d'obtenir une diminution supplémentaire de d_{32} , comme le montrent les deux figures. Enfin, on retiendra que toutes les mousses ont tenu suffisamment de temps une fois formées pour que leur texture ainsi que leur stabilité, à la fois à court et à long termes, puissent être étudiées.

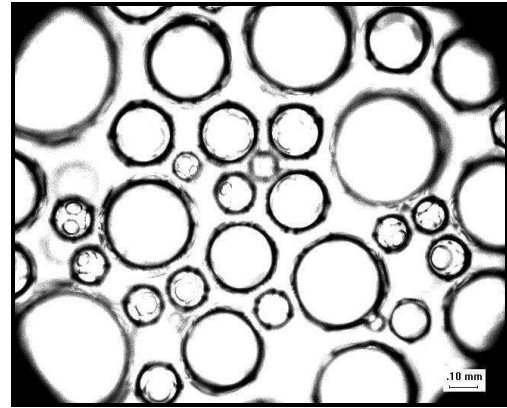
III.1.2. Influence des conditions opératoires

Effet de la vitesse d'agitation

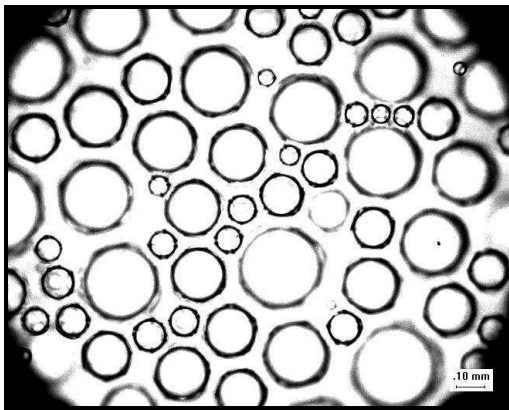
D'une façon générale, les résultats obtenus sur l'effet de la vitesse du rotor sont en accord avec les considérations théoriques. Par exemple, *Labbafi (2006)* a expliqué que les contraintes mécaniques, donc l'énergie dissipée, augmentent avec N , ce qui devrait favoriser la dispersion du gaz sous forme de bulles plus petites dont la taille finale résulte de l'équilibre dynamique entre les effets hydrodynamiques (cisaillement et élongation en régime laminaire, turbulence...) et les forces interfaciales (telles que tension de surface, mais aussi les effets élastiques des couches adsorbées). Il existe cependant des cas dans lesquels une agitation trop intense conduit à ces résultats opposés, soit parce que la renaissance est favorisée, soit parce que l'agitation entraîne une désorption des couches adsorbées : c'est le phénomène de *surbattage*, déjà décrit précédemment. Dans le cadre de notre étude expérimentale, l'effet classique de la vitesse d'agitation a été confirmé. Tout d'abord, pour TF, lorsque le pistonnage a été observé (temps de séjour court, foisonnement sous pression...), la quantité de gaz incorporée dans la mousse a toujours été améliorée par une augmentation de N , parfois même jusqu'à une disparition du phénomène de pistonnage. De même, une forte diminution des tailles de bulles a été observée lorsque la vitesse d'agitation a été augmentée de 400 à 1600 tpm. Ce comportement se reproduit à l'identique sur les solutions de WPI natives et celles traitées thermiquement. A titre d'illustration, après traitement à 80°C, le diamètre de Sauter des mousses foisonnées à 400 tpm est de 451 μm , alors que les mousses produites à une vitesse d'agitation de 1600 tpm présentent un d_{32} presque quatre fois inférieur, d'environ 143 μm , comme le montre la Figure III.41.



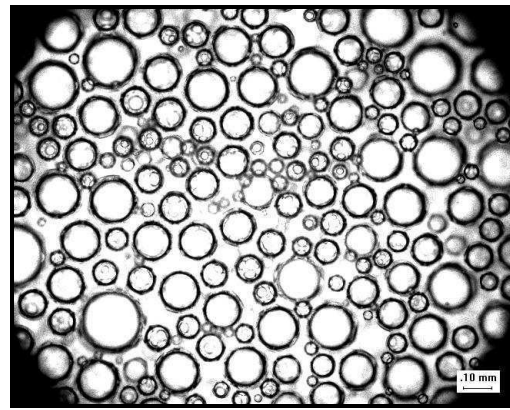
$d_{32}=451 \mu m$ (3%-80°C-400tpm-atmosphérique-
30L/60G)



$d_{32}=320 \mu m$ (3%-80°C-800tpm-atmosphérique-
30L/60G)



$d_{32}=197 \mu m$ (3%-80°C-1200tpm-atmosphérique-
30L/60G)



$d_{32}=143 \mu m$ (3%-80°C-1600tpm-atmosphérique-
30L/60G)

Fig. III.41. Evolution de la taille des bulles dans la mousse en fonction de N.

De plus, cette forte tendance à la diminution des tailles est accompagnée par une uniformisation très significative de la distribution des tailles de bulles dans la mousse qui peut également être clairement observée sur la Figure III.42. En résumé, plus les bulles sont petites, plus la mousse est monodisperse et plus longtemps la mousse devrait être stable.

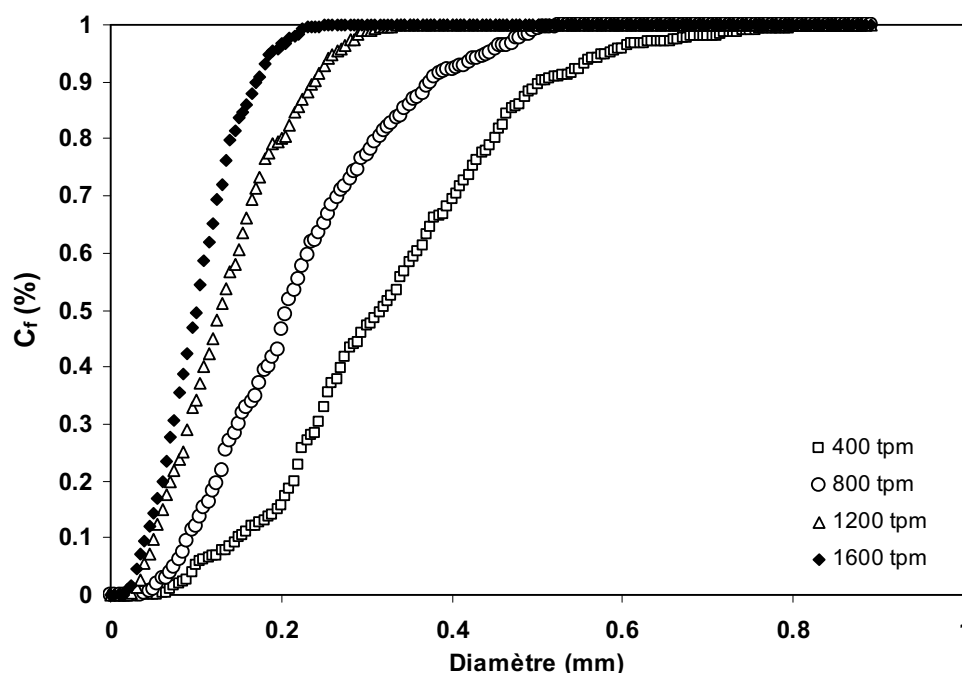


Fig. III.42. Effet de la vitesse d'agitation sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (3%-80°C-atmosphérique-30L/60G).

En conclusion, l'effet de la vitesse d'agitation sur la taille des bulles dans les mousses a été confirmé en employant comme outil un système d'analyse d'images en ligne. Les vitesses élevées favorisent la dispersion du gaz non seulement en termes de taux de foisonnement, mais on retiendra aussi qu'une forte diminution de la taille des bulles accompagnée d'une uniformisation significative de la distribution des tailles a été observée. Ceci concerne à la fois les mousses produites à partir de solutions de WPI natives, mais également celles obtenues à partir de solutions de WPI dénaturées par la chaleur. Nos résultats sont donc en accord avec la majorité des travaux qui se sont penchés sur l'influence de la vitesse d'agitation sur le foisonnement en continu. En effet, ceux-ci ont en général conclu que l'augmentation de la vitesse d'agitation se traduit par une amélioration du foisonnement parce qu'elle conduit à la diminution de la taille moyenne des bulles lorsque le taux de foisonnement maximal est atteint, ceci étant vrai aussi bien en régime laminaire (*Djelveh et coll., 1995 et 1999 ; Hanselmann et coll., 1999 ; Thakur et coll., 2003a*) qu'en régime turbulent (*Kroezen et coll., 1987 et 1988a ; Hanselmann et coll., 1999*).

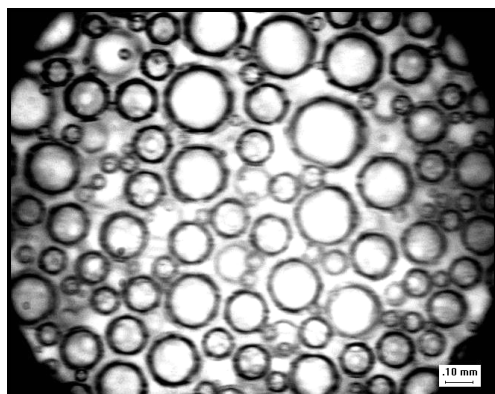
Effet de la pression

Globalement, travailler sous pression à 2 bars favorise le pistonnage. Cela signifie que les effets négatifs d'un travail sous pression l'emportent sur les effets bénéfiques (réduction du volume occupé par le gaz dans le foisonneur). Sous pression, le pistonnage s'est toujours manifesté à faible vitesse (400 tpm, voire 800 tpm) quel que soit le temps de séjour, et ceci indépendamment du traitement thermique. Une explication possible est que les mousses protéiques étant essentiellement autostabilisées par les interactions entre les interfaces des bulles adjacentes, réduire le volume occupé par le gaz dans le foisonneur peut donc également se traduire par une stabilisation plus difficile des interfaces eau-air. Une autre conséquence possible de la compression de la phase gaz est la diminution de l'intensité des contraintes mécaniques entre les interfaces adjacentes qui contribuent à la dispersion du gaz. Les deux mécanismes décrits précédemment favorisent la recoalescence des bulles, plus petites et plus nombreuses à cause de la pression. Dans ce cas, une vitesse d'agitation plus élevée à 2 bars qu'à pression atmosphérique devient donc nécessaire afin de disperser la même quantité de gaz. Cette explication est en accord avec le fait que le foisonnement est défavorisé par la pression surtout à faible vitesse d'agitation.

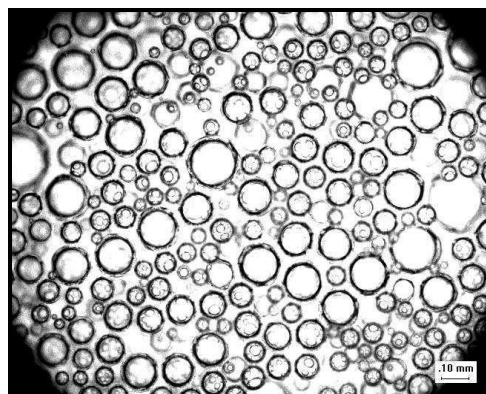
Comme attendu, une diminution importante des tailles de bulles a été observée lorsque le foisonnement a été conduit à une pression de 2 bars, aussi bien pour les mousses produites à partir de WPI natives que pour les mousses à base de WPI dénaturées par la chaleur, même lorsque l'incorporation du gaz est totale (Figure III.43. et Figure III.44.). Par exemple, le diamètre de Sauter est environ deux fois plus petit lorsque le foisonnement est conduit à 2 bars et la distribution des tailles de bulles devient plus uniforme que dans les mousses produites à pression atmosphérique. Toutefois, on notera que cette amélioration ne se cumule pas avec celle induite par le traitement thermique, comme cela est illustré par la Figure III.43.

Dans la littérature sur le foisonnement en continu (*Labbafi, 2006 ; Kroezen, et coll. 1987*), il a été démontré expérimentalement qu'il est bien souvent indispensable de travailler sous pression (2 à 3 bars en général) pour pouvoir atteindre le taux de foisonnement désiré. Toutefois, des résultats contradictoires ont également été obtenus et il n'existe en fait aucune règle établie pour le choix de la pression de fonctionnement d'un foisonneur continu en dehors du savoir-faire empirique obtenu par les industriels, généralement limité à un produit particulier et qui est rarement publié. Par exemple, *Labbafi (2006)* a trouvé une valeur optimale (3 bars) de la pression

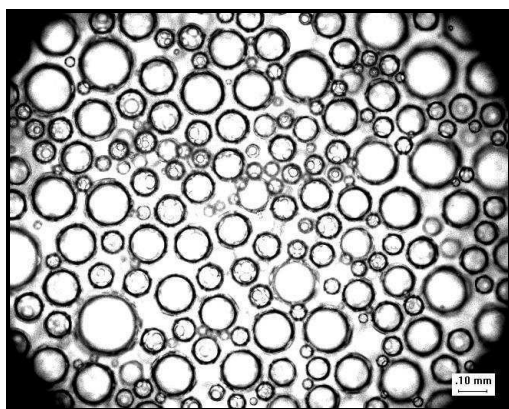
de fonctionnement lors du foisonnement d'une mousse laitière à 20% de matières grasses dans une installation de type rotor-stator permettant une amélioration du taux de foisonnement, ainsi que l'obtention des tailles de bulles très petites, mais il faut noter que ce résultat ne s'extrapole pas à d'autres formulations étudiées par le même auteur dans la même installation et qu'il semble dépendre de l'état de coalescence partielle de la matière grasse.



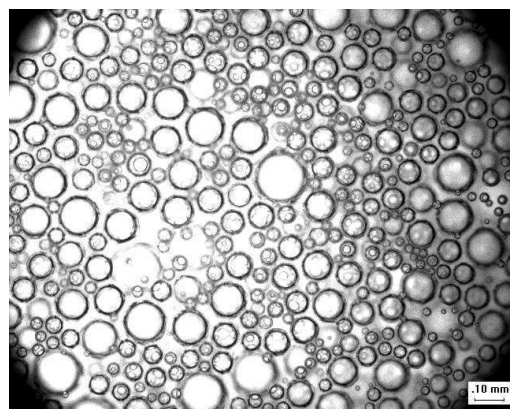
$d_{32}=167 \mu\text{m}$ (3%-native-1600tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=81 \mu\text{m}$ (3%-native-1600tpm-2 bars -30L/60G)



$d_{32}=143 \mu\text{m}$ (3%-80°C-1600tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=87 \mu\text{m}$ (3%-80°C-1600tpm-2 bars-30L/60G)

Fig. III.43. Evolution de la taille des bulles dans la mousse en fonction de la pression.

En conclusion, on retiendra que travailler sous pression à 2 bars conduit à une détérioration des performances du foisonneur sur la formulation étudiée ; même si cela ne permet pas de conclure définitivement sur l'effet de la pression puisqu'une seule valeur a été étudiée.

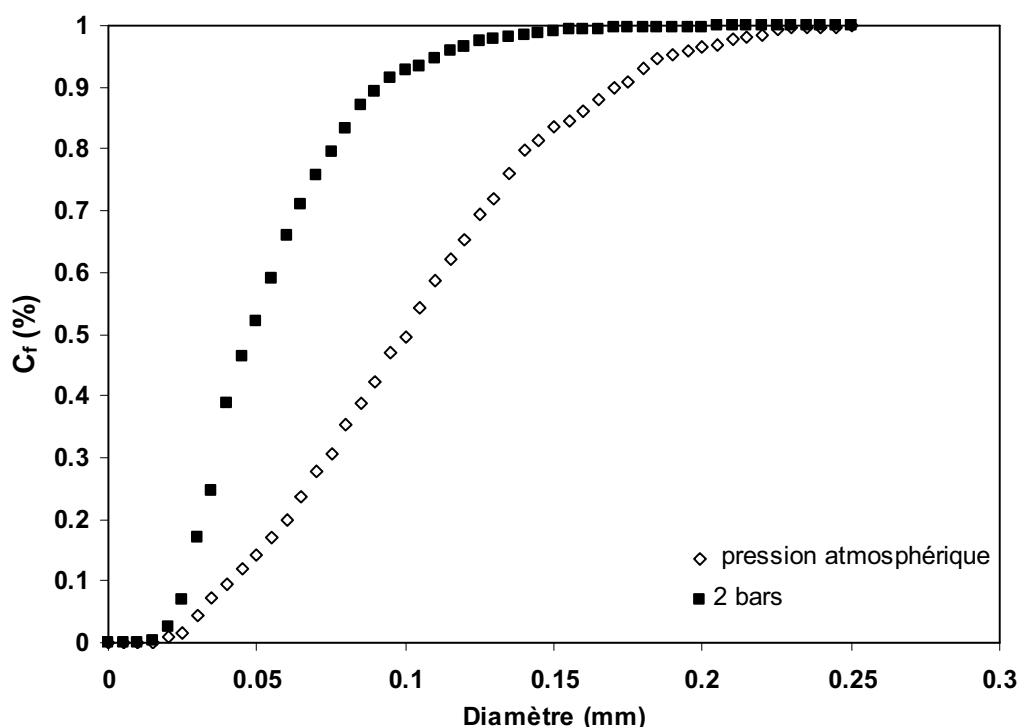


Fig. III.44. Effet de la pression sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (3%-80°C-30L/60G-1600 tpm).

Effet du temps de séjour

En ce qui concerne le taux de foisonnement, une diminution du temps de séjour se traduit par une plus grande difficulté à incorporer la totalité du gaz dans la mousse et donc par le phénomène de pistonnage, aussi bien sous pression atmosphérique qu'à 2 bars. Cela est en accord avec le fait qu'il faut un temps minimum pour un traitement mécanique donné pour disperser la totalité du gaz ; celui-ci diminue lorsque N augmente, comme attendu.

Cette analyse est confirmée par l'analyse des distributions de taille des bulles. En effet, sur la Figure III.45., nous avons observé qu'un temps de séjour court conduit à une microstructure très polydisperse, alors que le foisonnement à un temps de séjour long serait plutôt bénéfique et mènerait à une uniformisation significative de la dispersion des tailles, ainsi qu'à une diminution marquée de d_{32} . Cette tendance a été observée aussi bien lors du foisonnement à pression atmosphérique que lors du foisonnement à 2 bars, quel que soit le traitement thermique

appliqué. Ceci nous permet de conclure que lors du foisonnement en continu, réduire le temps de séjour ne permet pas toujours d'atteindre le taux de foisonnement maximal de la mousse et que, même si celui-ci est atteint, cette diminution conduit à des bulles plus grosses et à une dispersion des tailles beaucoup plus large.

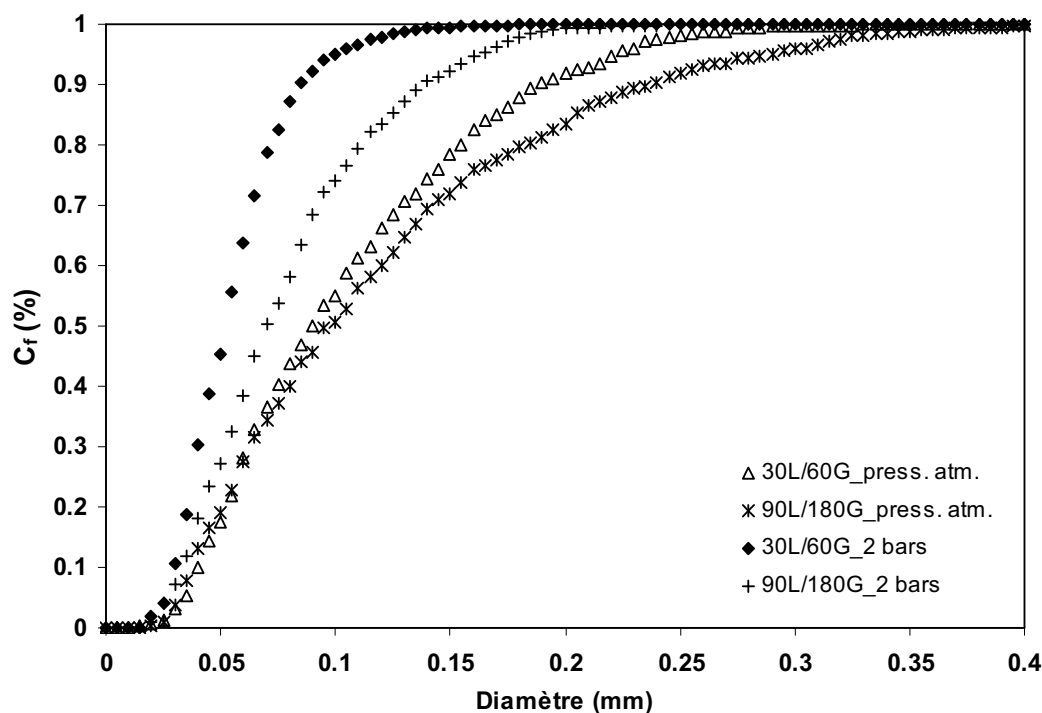


Fig. III.45. Effet du temps de séjour sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (3%-native-1600tpm).

III.1.3. Conclusions

En fin de compte, nos résultats expérimentaux sur l'installation de type rotor-stator nous ont permis de confirmer qu'il existe un effet positif du traitement thermique sur le foisonnement en continu, notamment à 80°C, qui se traduit par une diminution de la taille moyenne des bulles. En revanche, le traitement thermique ne permet pas d'améliorer le taux de foisonnement lorsque les 200% ne sont pas atteints en raison des conditions opératoires. Ces dernières jouent un rôle clé sur le foisonnement en continu des solutions de WPI, leurs effets les plus visibles ayant également été mis en évidence sur la distribution des tailles de bulles. Ainsi, augmenter la vitesse d'agitation ou le temps de séjour favorise le foisonnement, alors qu'augmenter la pression

permet de diminuer la taille moyenne des bulles, mais au prix d'un risque de pistonnage accru. Un dernier résultat important est que les tendances sont similaires avec ou sans traitement thermique des solutions de WPI, et que quantitativement, les effets de la vitesse d'agitation et de la pression de fonctionnement sont ceux qui permettent la diminution la plus significative de d_{32} , bien plus que le traitement thermique des protéines ou le temps de séjour.

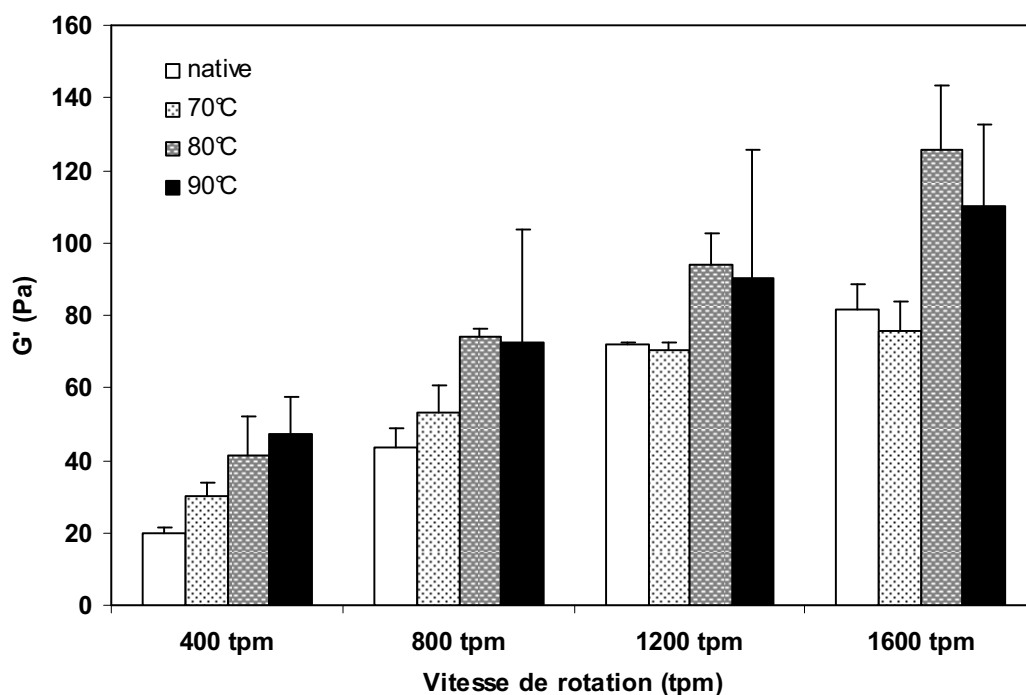


Fig. III.46. Effet du traitement thermique sur la texture de la mousse (3%-30L/60G et pression atmosphérique).

III.2. TEXTURE DES MOUSSES

III.2.1. Impact du traitement thermique

Sur la Figure III.46., nous présentons l'évolution de la texture des mousses avec le traitement thermique. Nous pouvons noter que dans les conditions de cette figure, c'est-à-dire à pression atmosphérique et à temps de séjour long, nous n'avons noté qu'une amélioration limitée de G' avec le traitement thermique ; de plus, à des vitesses élevées, l'erreur expérimentale sur les résultats obtenus pour les échantillons traités à 90°C devient importante, ce qui résulte

vraisemblablement d'une déstabilisation plus rapide des mousses formées dans les conditions de la mesure rhéologique, c'est-à-dire lorsque la mousse est étudiée en couche mince. Il est en effet évident qu'une mousse de taux de foisonnement 200% sera plus rapidement déstabilisée par drainage qu'une mousse pour laquelle $TF=1000\%$, ce qui rend les mesures de texture des mousses plus délicates avec le rotor-stator.

Finalement, il semblerait que la forte amélioration de G' que nous avons observée lors du foisonnement sur le batteur de type « KitchenAid » ne soit pas parfaitement transposable lorsqu'on foisonne en continu sur une installation de type rotor-stator. Ce résultat n'est pas totalement surprenant car en batteur, les mousses formées présentaient un taux de foisonnement compris entre 800% et 1000%, pour lequel de petites variations de TF , de d_{32} ou de la structure de la mousse pouvaient se traduire par de fortes variations de G' (Equation III.1. pour les mousses sèches). En continu, le taux de foisonnement maximal, limité par les débits, est de 200% ; il est constant lorsque tout le gaz est incorporé et G' est beaucoup moins sensible à d_{32} puisqu'il s'agit d'une mousse humide. Les résultats obtenus dans cette section ne sont donc pas en contradiction avec ceux obtenus précédemment en batteur ménager, mais ils traduisent le fait que la texture est moins sensible aux variables étudiées dans les conditions choisies pour le système rotor-stator.

III.2.2. Influence des conditions opératoires

Influence de la vitesse d'agitation et de la pression

Concernant l'effet de la vitesse d'agitation sur la texture des mousses sur la Figure III.46., nous pouvons affirmer qu'une amélioration de G' a été observée, indépendamment de l'effet produit par la dénaturation thermique des solutions de WPI lorsque N augmente. Il en va de même pour une augmentation de pression. Globalement, ces résultats sont en accord avec le fait que G' augmente généralement lorsque d_{32} diminue, même pour les mousses humides. Toutefois, lorsque le foisonnement des solutions protéiques a été conduit à 2 bars, on assiste, comme à vitesse d'agitation élevée, à un élargissement de l'erreur expérimentale sur les mesures de G' (Figure III.47.). Ceci résulte principalement du fait que le retour de la mousse à l'atmosphère s'accompagne d'une expansion des bulles due à la chute de pression, ce qui se traduit par une déstabilisation plus rapide de la mousse au cours du temps pendant la mesure sous le rhéomètre.

Sous pression, ce phénomène semble même devenir dominant sur la mesure de texture via G' ; comme précédemment, cela se traduit par le fait que la variation de G' en fonction des conditions opératoires et du traitement thermique est moins significative que l'on pouvait l'espérer.

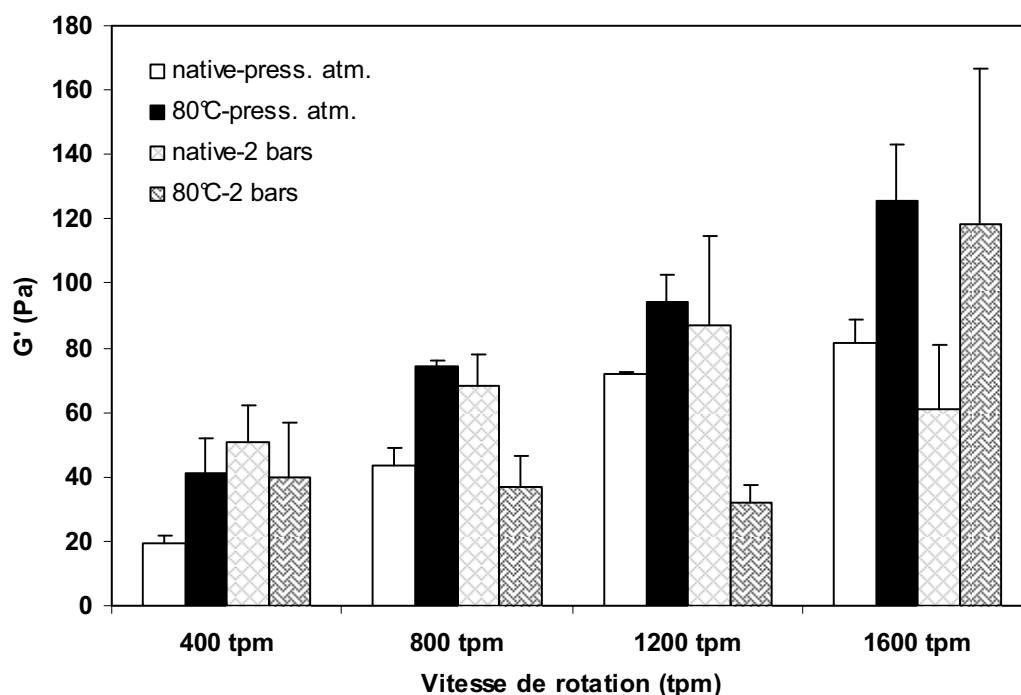


Fig. III.47. Effet de la vitesse d'agitation et de la pression sur la texture de la mousse (3%-30L/60G).

Influence du temps de séjour

Lorsque l'influence du temps de séjour sur la texture des mousses a été étudiée, les résultats ont démontré que le foisonnement à des temps de séjour plus longs conduit à des mousses présentant des G' plus élevés à pression atmosphérique (Figure III.48). Pour une pression de 2 bars (Figure III.49.), les résultats sont moins clairs car seule une partie des expériences a permis une incorporation totale du gaz. Toutefois, la même conclusion peut être formulée à taux de foisonnement constant, sauf à 1600 tpm où les incertitudes sur les données expérimentales sont très larges. Ceci rejoint les résultats précédents sur la difficulté de l'estimation de G' à vitesse d'agitation élevée et sous une pression de 2 bars.

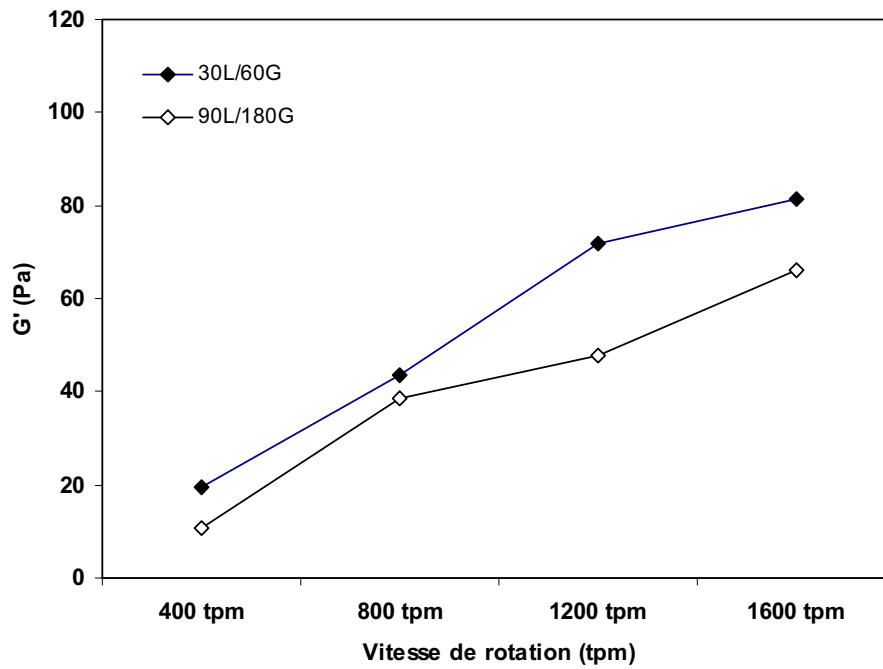


Fig. III.48. Effet du temps de séjour sur la texture de la mousse (3%-native-atmosphérique).

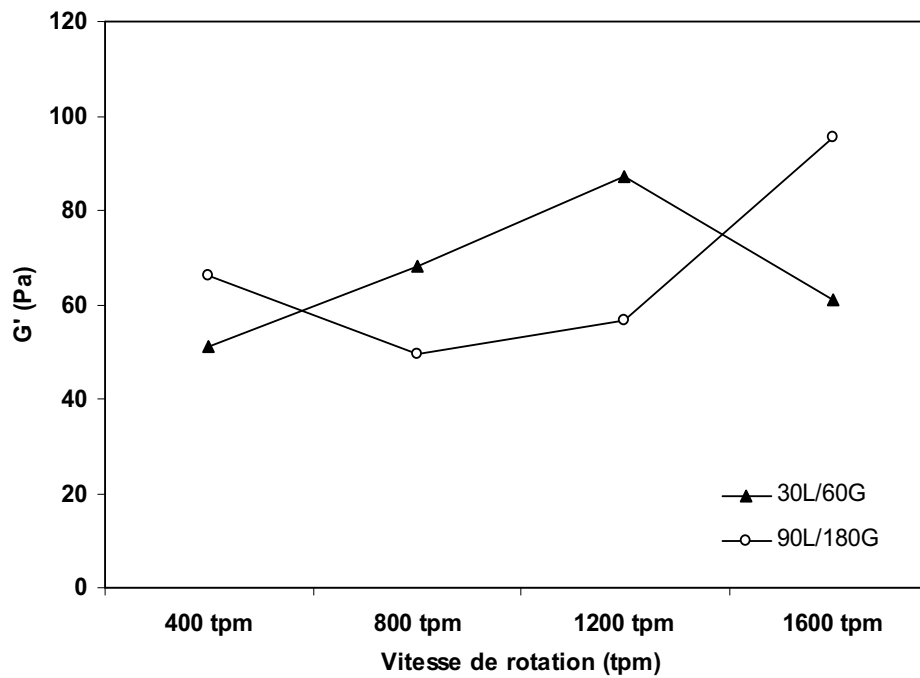


Fig. III.49. Effet du temps de séjour sur la texture de la mousse (3%-native-2 bars).

III.2.3. Conclusions

Globalement, les résultats obtenus sur la texture sont en accord avec les attentes. Une augmentation de G' est observée suite à un traitement thermique à un minimum de 80°C, mais elle reste moindre que celle observée en batteur à cause de la différence entre les taux de foisonnement atteints. Comme précédemment, l'effet de la vitesse d'agitation est le plus important sur G' , devant celui de la pression et du traitement thermique des WPI.

III.3. STABILITE DES MOUSSES

III.3.1. Stabilité à court terme (3 h)

La stabilité à court terme des mousses face au drainage du liquide est principalement reliée aux propriétés interfaciales des protéines, notamment leur adsorption et leur réarrangement aux interfaces eau-air afin de former un film protéique. En se basant sur la Figure III.50., nous pouvons observer que les mousses obtenues à partir des WPI natives sont les plus instables face au drainage, alors que les plus stables sont les mousses formées à partir de WPI dénaturées à 80°C et foisonnées à 2 bars. En effet, dans ce cas, la mousse commence à se déstabiliser seulement au bout de 3 heures ; le liquide draine lentement et à la fin du drainage, un squelette de mousse sèche reste encore présent dans le cristalliseur. En revanche, dans le cas des trois autres mousses de la figure, dès que le processus de déstabilisation commence, le liquide draine très rapidement pour former une mousse sèche de faible volume. En ce qui concerne la stabilité des mousses générées à partir des WPI dénaturées à 70°C, nous n'avons pas observé d'amélioration significative de la stabilité à court terme : le temps de 1^{ère} goutte est d'environ 120 s. Ce résultat est en accord avec les précédents qui montrent un effet significatif du traitement thermique seulement à partir de 80°C.

En conclusion, l'effet significatif du traitement thermique observé sur des mousses à $TF \geq 800\%$ est confirmé sur des mousses formées en continu pour lesquelles $TF = 200\%$. L'effet du traitement thermique est ici le facteur le plus significatif. Si la pression et la vitesse d'agitation ont un effet plus faible, ces deux variables améliorent aussi sensiblement la stabilité des mousses,

probablement parce qu'en contribuant à diminuer fortement d_{32} , elles renforcent le rôle des interfaces et donc celui des protéines adsorbées sur la stabilité à court terme de la mousse.

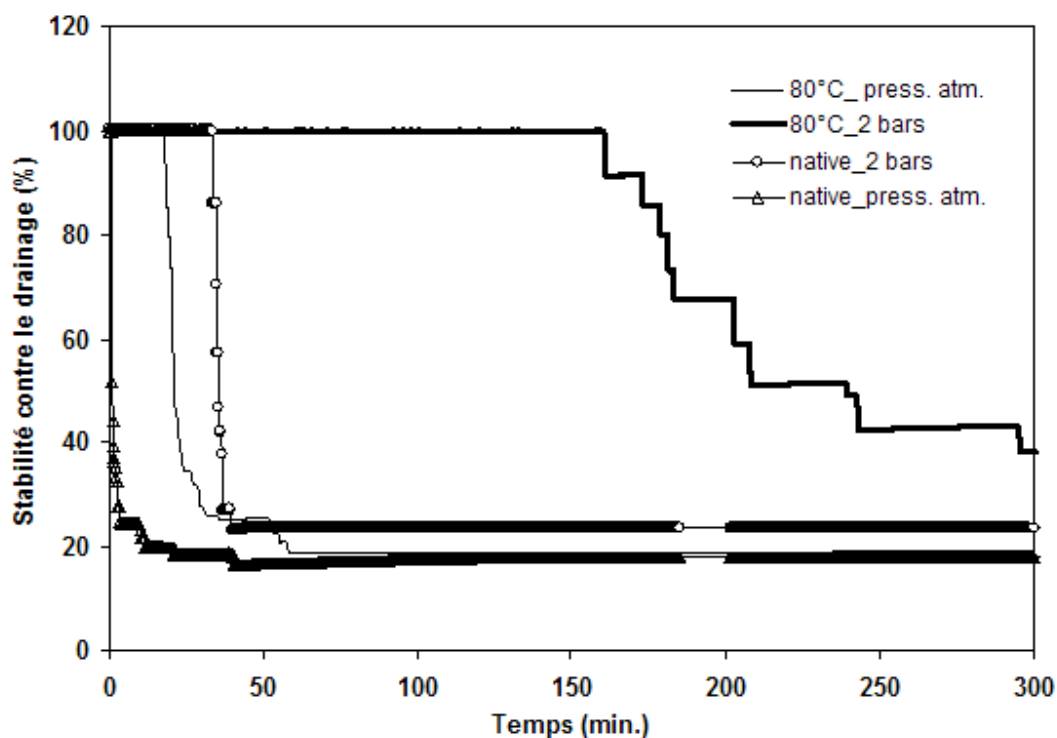


Fig. III.50. Effet du traitement thermique et de la pression sur la stabilité à court terme de la mousse (3%-30L/60G-1600 tpm).

III.3.2. Stabilité à long terme des mousses (72 h)

Effet du traitement thermique

Sur la Figure III.51., nous présentons l'évolution de la stabilité au cours du temps des mousses lorsque les solutions protéiques ont subi un traitement thermique entre 70°C et 90°C en amont du foisonnement. Nous avons ainsi pu remarquer une forte amélioration de la stabilité des mousses formées à partir des WPI dénaturées par la chaleur, surtout à 80°C, et plus particulièrement après une durée supérieure à 40h. Sur l'installation de type rotor-stator, nous avons mis en évidence un fort effet stabilisant du traitement thermique aux temps longs, indépendamment des autres conditions opératoires telles que la vitesse d'agitation (Figure III.52.) ou la pression. En effet, la forte amélioration de la stabilité à long terme sur la Figure III.51 peut être attribuée à la formation

des agrégats protéiques dans le milieu parce que dans le cas des solutions protéiques natives, les mousses s'effondrent beaucoup plus vite.

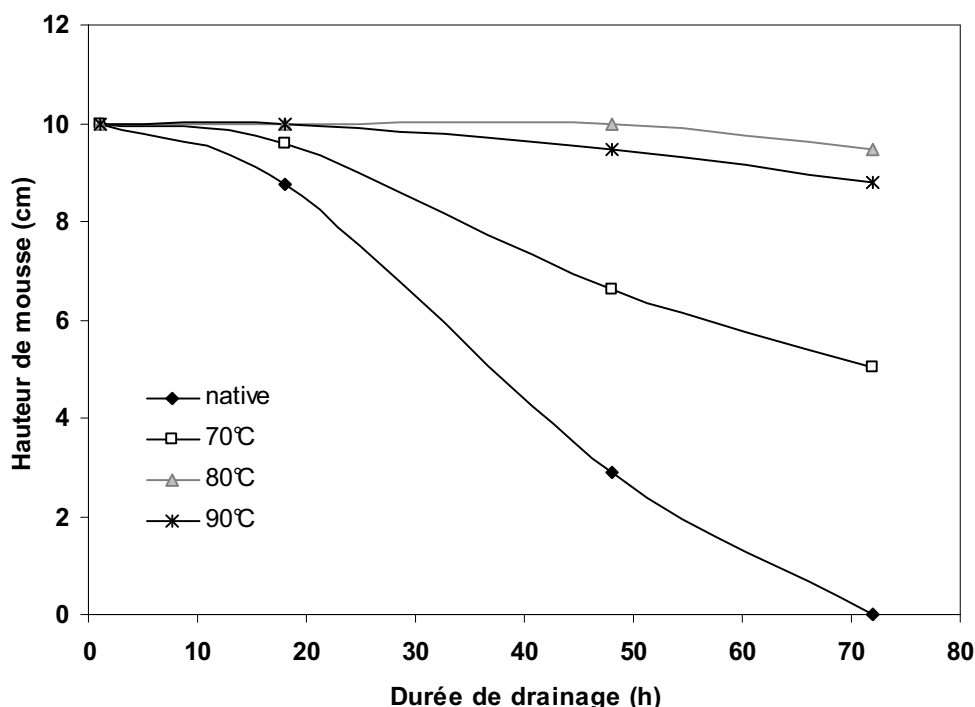


Fig. III.51. Effet du traitement thermique sur la stabilité à long terme de la mousse (3%-30L/60G-atmosphérique-1600 tpm).

Dans cette étude, par traitement thermique, nous avons produit une fraction d'agrégats solubles assez faible (entre 8 et 15% w/w) et un pourcentage d'agrégats insolubles limité (entre 1 et 9%) qui augmentent avec la température appliquée (Tableau III.9.). Par conséquent, on dispose encore dans la solution de largement assez de monomères protéiques pour s'adsorber rapidement aux interfaces et assurer ainsi la stabilisation rapide des films interfaciaux des mousses puisque TF est limité à 200%, les agrégats solubles permettant alors d'accroître dans un second temps la stabilité des films interfaciaux formés.

Enfin, la comparaison avec la I^{ère} partie de notre étude, doit tenir compte de 2 paramètres nouveaux, tels que :

- ✓ le changement d'échangeur qui se traduit par un degré plus élevé de dénaturation mais une diminution de la proportion d'agrégats solubles (Tableau III.9.) ;
- ✓ un TF fixé différent.

Effet de la vitesse d'agitation

Lors de notre étude, nous avons également analysé l'effet couplé du traitement thermique et de la vitesse d'agitation sur la stabilité à long terme des mousses. La Figure III.52., présentée en exemple, montre l'évolution de la déstabilisation de la mousse lorsque la vitesse d'agitation varie entre 400 et 1600 tpm. Celle-ci peut être expliquée comme précédemment par une diminution de d_{32} lorsque N augmente. Nous pouvons donc observer que l'augmentation de la vitesse d'agitation favorise la stabilisation de la mousse, mais aussi que le traitement thermique reste le principal facteur qui gouverne le processus de stabilisation des mousses. Ainsi, c'est dans le cas des mousses produites à faible vitesse d'agitation en l'absence de traitement thermique (notamment à 400 tpm) que l'effet stabilisant dû au traitement thermique que nous avons décrit à partir de la Figure III.51 apparaît le plus visiblement. A contrario, l'effet de la vitesse d'agitation devient négligeable suite à un traitement thermique des solutions de WPI à 80°C ou 90°C. Ceci est particulièrement intéressant car il montre tout l'intérêt de la présence d'agrégats protéiques dans les produits foisonnés.

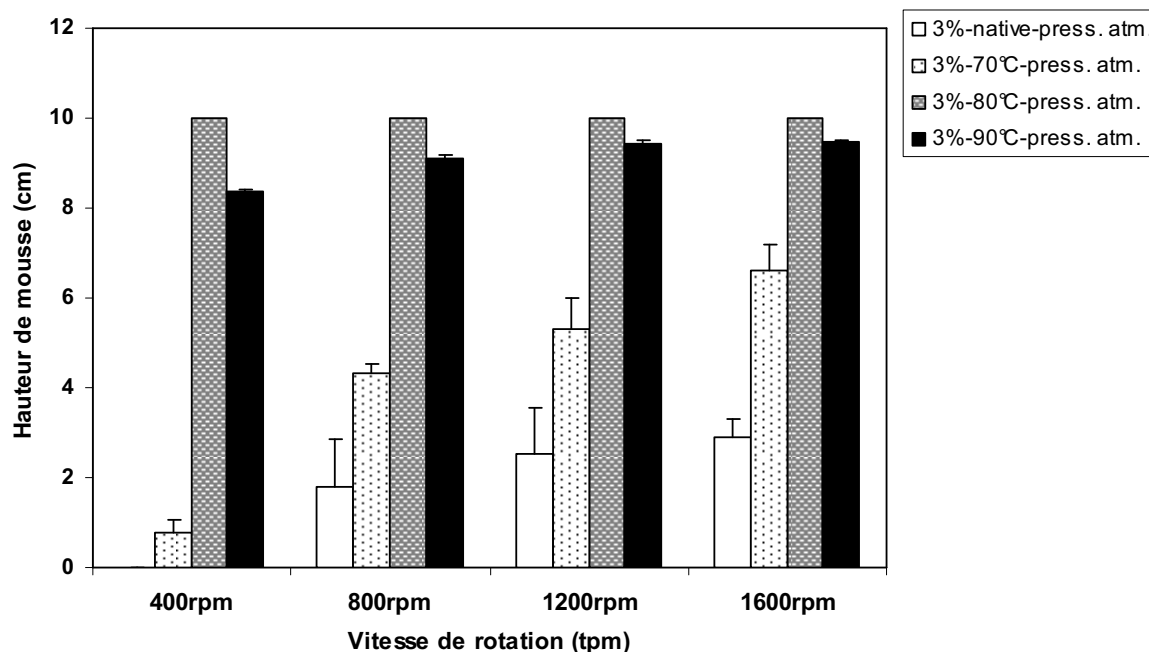


Fig. III.52. Effet du traitement thermique et de la vitesse d'agitation sur la stabilité de la mousse après 48h (3%-30L/60G-atmosphérique).

Effet de la pression

Sur la Figure III.53, nous présentons les résultats expérimentaux obtenus lors du foisonnement des solutions de WPI à une pression de 2 bars. On notera que la stabilité à long terme des mousses n'a pas été sensiblement améliorée dans le cas des solutions de WPI natives. Au contraire, elle a même diminué dans le cas des WPI dénaturées à 80°C au bout de 48 h de déstabilisation. On retrouve un résultat qualitativement similaire à ce qui a été observé pour la vitesse d'agitation : en l'absence de traitement thermique, on observe une amélioration de la stabilité, mais bien plus faible pour la pression que pour N ; en revanche, après traitement thermique, les conditions opératoires ne contribuent plus à améliorer la stabilité de la mousse.

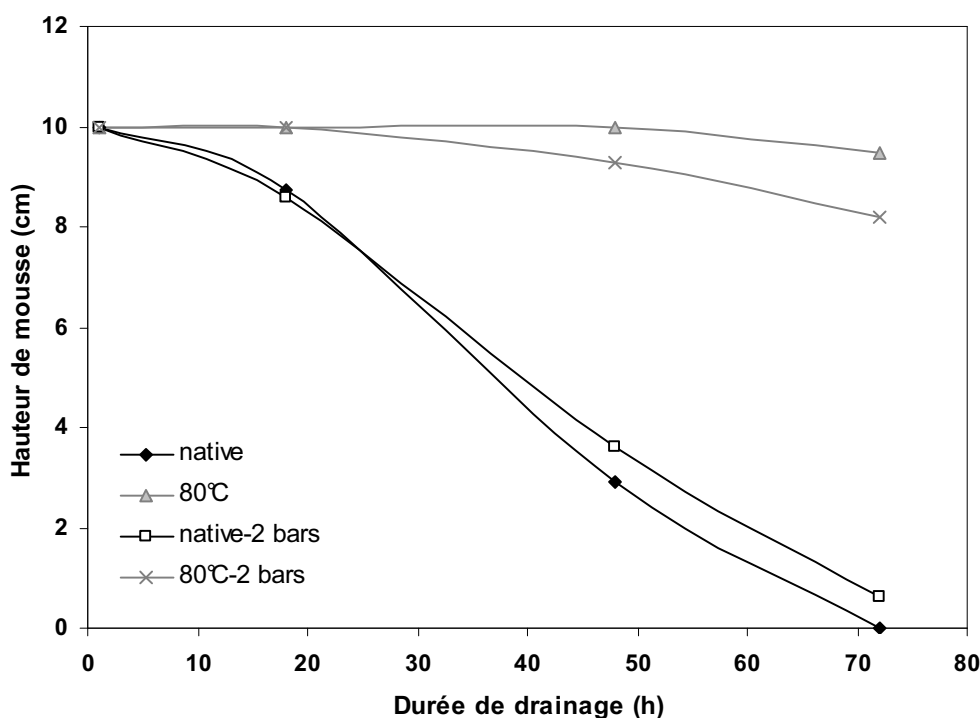


Fig. III.53. Effet de la pression sur la stabilité à long terme de la mousse (3%-30L/60G-1600 tpm).

Effet du temps de séjour

La Figure III.54. montre clairement que les temps de séjour longs favorisent la stabilité des mousses de protéines sériques natives. En ce qui concerne l'impact du temps de séjour, une

première raison susceptible d'expliquer ce phénomène est la différence marquée entre les d_{32} en fonction du temps de séjour (Figure III.45.). De plus, un temps de séjour long laisse plus de temps aux protéines pour se placer aux interfaces et atteindre une conformation susceptible de stabiliser les bulles. Ceci est d'autant plus vrai pour les agrégats protéiques. Toutefois, comme précédemment, cet effet est secondaire quand on le compare à l'influence du traitement thermique amont sur la stabilité des mousses.

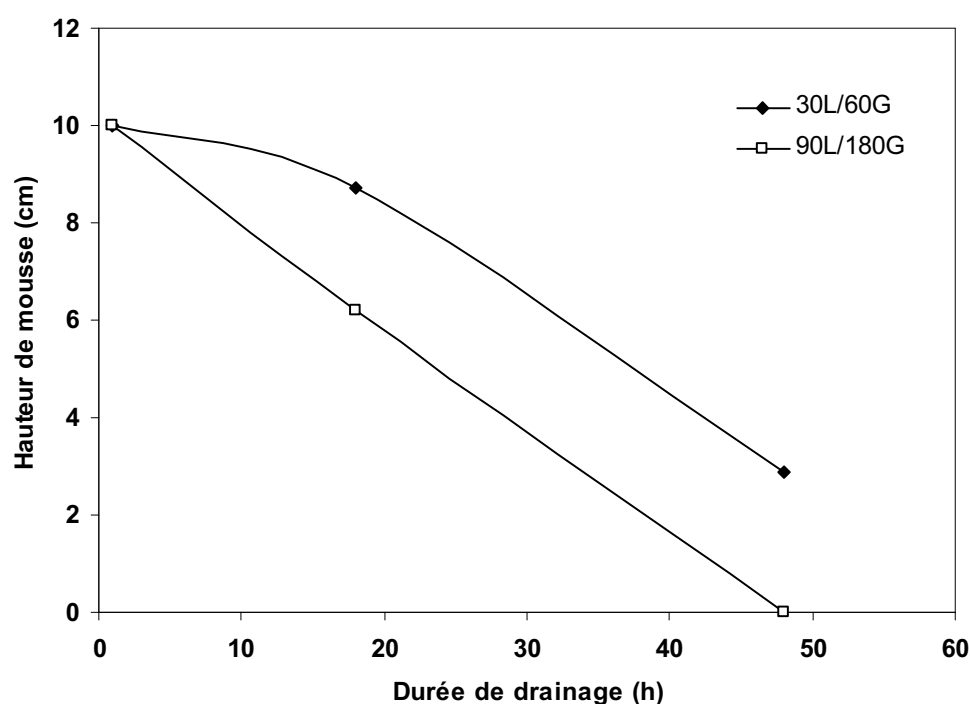


Fig. III.54. Effet du temps de séjour sur la stabilité à long terme de la mousse (3%-native-atmosphérique-1600 tpm).

III.3.3. Conclusions

Contrairement aux diamètres de bulles et au taux de foisonnement qui dépendaient essentiellement des conditions opératoires, la stabilité des mousses, aussi bien à court terme qu'à long terme, est principalement gouvernée par l'état de dénaturation et d'agrégation des protéines suite à un traitement thermique amont. Les résultats obtenus sont en parfait accord avec ceux en discontinu et montrent qu'un traitement thermique des protéines améliore la

stabilité de la mousse, à la fois contre le drainage et l'effondrement. Comme précédemment, on retiendra que les effets deviennent significatifs à partir de 80°C et qu'une température plus élevée n'apporte pas d'amélioration sensible. Les effets de la vitesse et du temps de séjour ne jouent ici qu'un rôle marginal dès qu'un traitement thermique a été appliqué, alors qu'ils améliorent la stabilité de la mousse en l'absence de traitement thermique lorsqu'ils contribuent à diminuer d_{32} .

III.4. CONCLUSIONS SUR LE FOISONNEMENT EN CONTINU

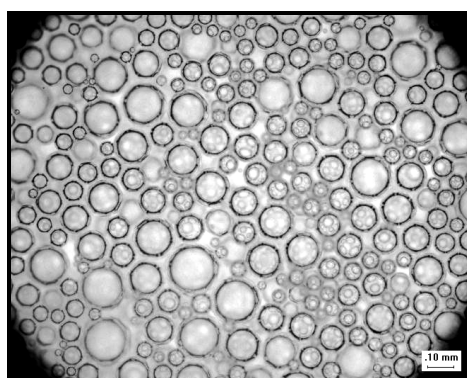
Le foisonnement en continu dans une unité rotor-stator diffère fondamentalement du foisonnement discontinu par le fait que le taux de foisonnement maximal est imposé par les débits et que dans le cas présent, la valeur retenue est très inférieure aux valeurs atteintes en batteur ménager (200% vs. 1000%). Malgré ces différences, les résultats obtenus par les deux méthodes sur l'effet du traitement thermique sont concordants, bien qu'ils soient modifiés pour le rotor-stator par un effet plus marqué des conditions opératoires. En résumé, les résultats expérimentaux de ce sous-chapitre peuvent être résumés en trois points :

- Le taux de foisonnement étant limité par les débits, il ne dépend que des conditions opératoires ; de plus, si le traitement thermique favorise une diminution de d_{32} , son effet est bien plus faible que ceux de la vitesse d'agitation et de la pression de fonctionnement.
- Un traitement thermique à 80°C ou plus semble améliorer la texture des mousses en augmentant G' . Toutefois, cet effet est moins marqué qu'en batteur ménager, tout d'abord parce que les taux de foisonnement sont plus faibles, mais aussi parce que l'effet des conditions opératoires sur la diminution de d_{32} présente également un effet significatif sur la texture des mousses.
- La stabilité des mousses dans le temps reste essentiellement gouvernée par l'état de dénaturation et d'agrégation des protéines, les conditions opératoires ne jouant ici qu'un rôle secondaire dès qu'un traitement thermique à 80°C ou plus est appliqué en amont aux solutions de WPI.

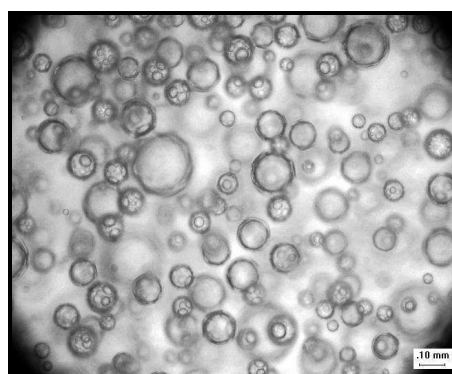
En conclusion, ces résultats illustrent bien la complexité du couplage entre les propriétés de la formulation qui gouvernent la stabilité des mousses, et celles du procédé qui déterminent leur microstructure, lors du foisonnement en continu.

IV. CARACTERISATION DES MOUSSES PROTEIQUES PRODUITES EN CONTINU – COLONNE A FAIBLE ENTREFER

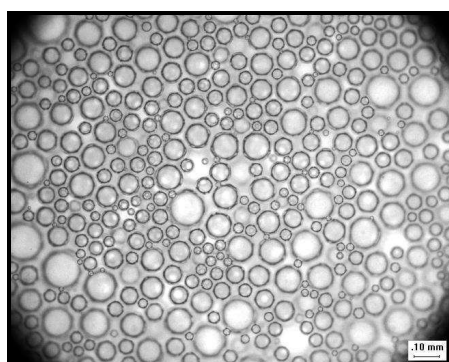
Dans ce quatrième sous-chapitre, nous présenterons les résultats expérimentaux obtenus lors du foisonnement en continu des solutions protéiques au moyen de l'installation dénommée « colonne à faible entrefer ». Les objectifs visés lors de cette étude sont les mêmes que sur l'unité rotor-stator ; les conditions opératoires étudiées (débits, pressions, vitesses...), ainsi que la composition de la solution de WPI employée avec la colonne à faible entrefer sont également identiques à celles détaillées précédemment au début du *sous-chapitre III* de notre manuscrit pour l'unité rotor-stator. Un objectif supplémentaire est de réaliser une comparaison technologique entre les deux types de foisonneurs continus.



$d_{32}=98 \mu m$ (3%-native-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=127 \mu m$ (3%-70°C-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=85 \mu m$ (3%-80°C-atmosphérique-30L/60G)

Fig. III.55. Evolution de la taille des bulles dans la mousse (N=1600 tpm) en fonction du traitement thermique.

IV.1. MICROSTRUCTURE DES MOUSSES

IV.1.1. Impact du traitement thermique

En termes de taux de foisonnement, si l'incorporation totale du gaz a toujours été possible pour les protéines natives à pression atmosphérique et pour un temps de séjour long, quelle que soit la vitesse d'agitation, le pistonnage apparaît dans ces mêmes conditions opératoires, par exemple aux vitesses les plus faibles, suite à un traitement thermique à 80°C.

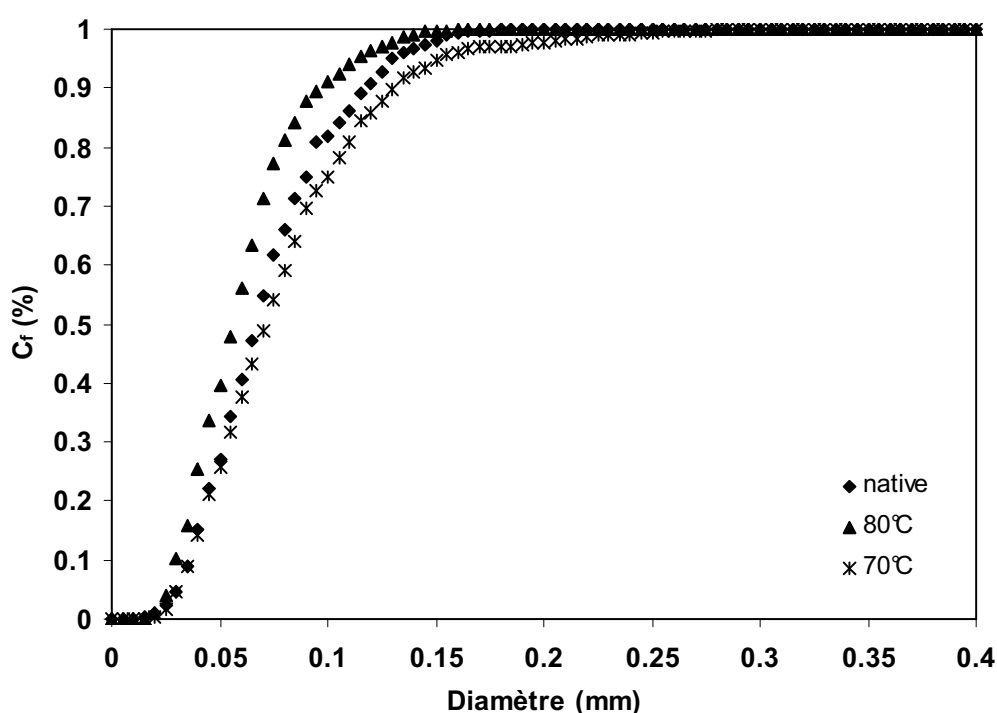


Fig. III.56. Effet du traitement thermique sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (à 1600 tpm, 30L/60G, pression atmosphérique).

Sur la Figure III.55., nous présentons également les images des bulles dans les mousses générées à partir des solutions de WPI natives ou bien traitées par la chaleur. A partir de ces images, nous pouvons affirmer qu'aucun effet bénéfique sur la taille ou bien sur la distribution des tailles de bulles dans les mousses (Figure III.56.) n'a été observé dans le cas des échantillons ayant subi un traitement thermique. Au contraire, nous avons même mis en évidence une augmentation de la

valeur du diamètre de Sauter lorsque le foisonnement a été conduit sur des solutions protéiques dénaturées par la chaleur, plus particulièrement pour la solution de WPI dénaturée à 70°C.

Les résultats décrits ci-dessus diffèrent fortement de ceux observés avec l'unité rotor-stator. Ils démontrent le rôle clé de la technologie sur le foisonnement en continu des solutions protéiques. En effet, si l'entrefer pale-paroi est plus faible dans la colonne à faible entrefer, d'où des gradients de vitesse localement plus élevés, les contraintes mécaniques sont fortement localisées dans l'entrefer et la colonne présente des zones dans lesquelles le fluide est faiblement cisailé :

- les régions situées entre les pales à proximité de l'axe ;
- les zones situées entre les trois mobiles.

Dans ces zones, la recalescence des bulles est donc possible, d'autant plus qu'à débit identique, la différence entre les volumes accessibles au fluide dans les deux foisonneurs continus fait que le temps de séjour est plus de deux fois plus grand dans la colonne à faible entrefer. Le traitement mécanique appliqué dans la colonne présente donc une bien plus grande hétérogénéité spatiale dans cette étude que dans la précédente ; c'est cette hétérogénéité qui semble a priori responsable de la moindre performance du foisonneur dans le cas présent.

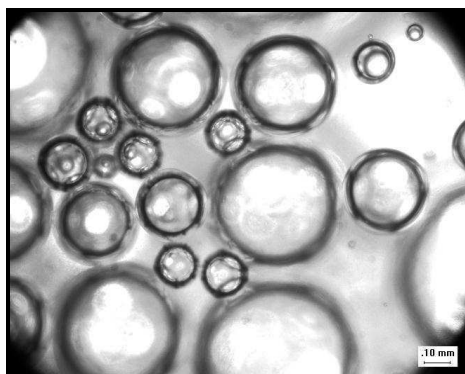
Comme cela avait été observé en batteur, le foisonnement est plus difficile suite à un traitement thermique à conditions opératoires fixées. Pour le rotor-stator, l'efficacité de la technologie en regard de l'objectif recherché (TF=200%) permettait de compenser cette différence. Cela ne semble plus être totalement le cas pour la colonne à faible entrefer ; une augmentation de la vitesse d'agitation sera donc nécessaire afin de maintenir le taux de foisonnement à la valeur cible suite à un traitement thermique et cela se traduit par le fait qu'à vitesse fixée, on n'observe plus de diminution significative du d_{32} après traitement.

IV.1.2. Influence des conditions opératoires

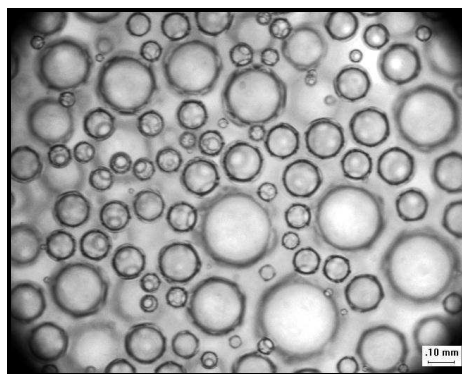
Effet de la vitesse d'agitation

Tout d'abord, pour TF, nous retrouvons un résultat attendu : lorsque le pistonage a été observé (temps de séjour court, foisonnement sous pression...), la quantité de gaz incorporée dans la mousse a toujours été améliorée par une augmentation de N, parfois même jusqu'à une

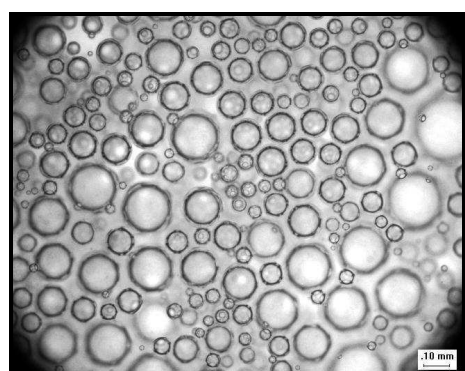
disparition du phénomène de pistonnage. L'effet classique de la vitesse d'agitation sur la taille des bulles a été également confirmé sur d_{32} (Figure III.57.). En effet, lorsque le foisonnement a été conduit à une vitesse d'agitation de 400 tpm, le diamètre de Sauter se montre six fois plus grand que dans le cas du foisonnement conduit à une vitesse d'agitation de 1600 tpm. On rappellera que des résultats similaires avaient été obtenus précédemment avec l'unité rotor-stator (Figure III.41.) et qu'ils sont valables avec ou sans traitement thermique préalable des protéines.



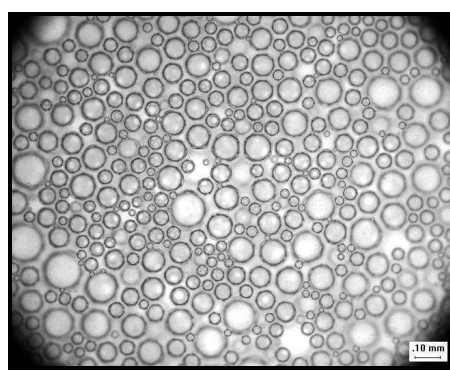
$d_{32}=525 \mu\text{m}$ (3%-80°C-400tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=213 \mu\text{m}$ (3%-80°C-800tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=120 \mu\text{m}$ (3%-80°C-1200tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=85 \mu\text{m}$ (3%-80°C-1600tpm-atmosphérique-30L/60G)

Fig. III.57. Evolution de la taille des bulles dans la mousse en fonction de N.

En revanche, par rapport au rotor-stator, on obtient des d_{32} plus élevés dans la colonne à faible entrefer aux faibles vitesses d'agitation telles que 400 tpm ($d_{32}=525 \mu\text{m}$ vs. $451 \mu\text{m}$ pour les protéines natives à pression atmosphérique et pour un temps de séjour long), alors que l'inverse est observé aux vitesses élevées telles que 1600 tpm ($85 \mu\text{m}$ vs. $143 \mu\text{m}$ pour les mêmes conditions que précédemment). En effet, sur la Figure III.58., nous pouvons observer une

différence très importante entre la distribution des tailles de bulles dans la mousse foisonnée à 400 tpm et celle de la mousse foisonnée à 1600 tpm, différence plus marquée que sur la Figure III.42.

Ces résultats sont en accord avec la comparaison technologique reportée précédemment. La colonne exerce localement les contraintes les plus élevées et, en l'absence de recoalescence, elle devrait permettre d'atteindre les d_{32} les plus faibles. Si cela est bien le cas à 1600 tpm, l'hétérogénéité spatiale des contraintes mécaniques la rend bien moins efficace que l'unité rotor-stator à faible vitesse d'agitation. La vitesse d'agitation jouera donc un rôle encore plus important sur les performances de cet appareil que pour l'unité rotor-stator et on peut s'attendre à ce qu'elles dépendent plus fortement des conditions opératoires.

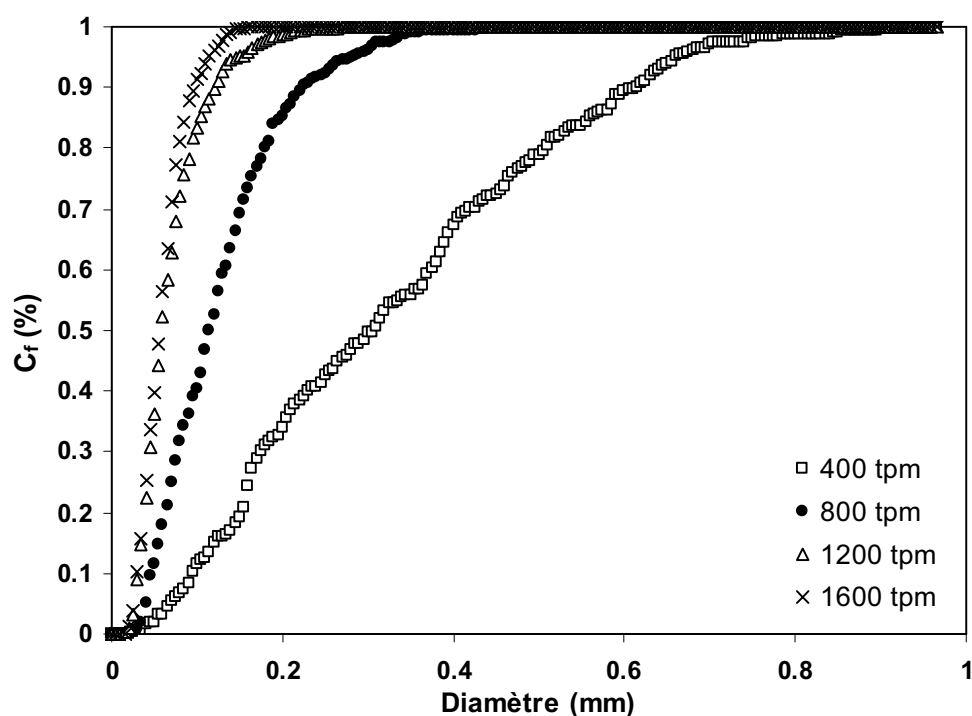


Fig. III.58. Effet de la vitesse d'agitation sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (3%-80°C-atmosphérique-30L/60G).

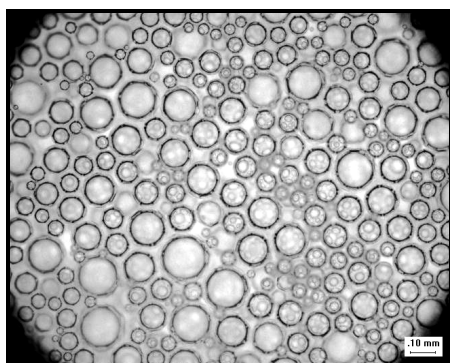
Effet de la pression

Comme précédemment, travailler sous pression favorise le pistonnage, quels que soient le temps de séjour et le traitement thermique appliqué. Toutefois, la pression semble avoir un rôle moins

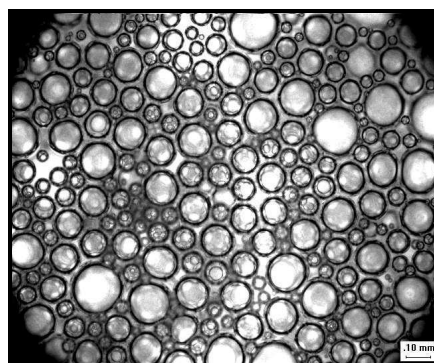
défavorable sur le foisonnement que pour l'unité rotor-stator puisque le pistonnage reste limité aux faibles vitesses d'agitation sur l'ensemble des conditions étudiées.

En revanche, l'analyse de l'effet de la pression sur les tailles de bulles n'a pas démontré d'impact favorable de la pression sur la microstructure de la mousse, à savoir sur la taille et la distribution des tailles des bulles, contrairement à l'unité rotor-stator. Les images de la microstructure présentées sur la Figure III.59., les diamètres de Sauter, ainsi que les distributions de la Figure III.60. confirment qu'il n'y a pas d'effet marqué de la pression de fonctionnement du foisonneur sur la microstructure des mousses.

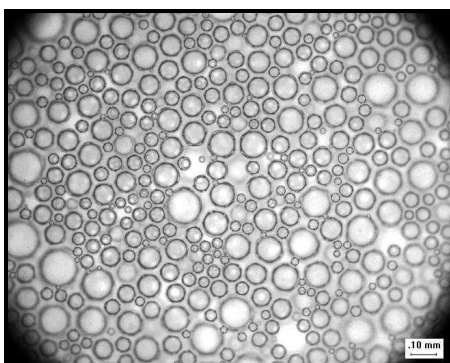
En conclusion, on retiendra que si travailler sous 2 bars est bien moins défavorable en termes de taux de foisonnement que sur l'unité rotor-stator, les gains obtenus précédemment sur d_{32} ne sont pas observés sur la colonne à faible entrefer et donc que l'application d'une pression ne présente qu'un intérêt limité, sauf à temps de séjour court, comme nous le verrons par la suite.



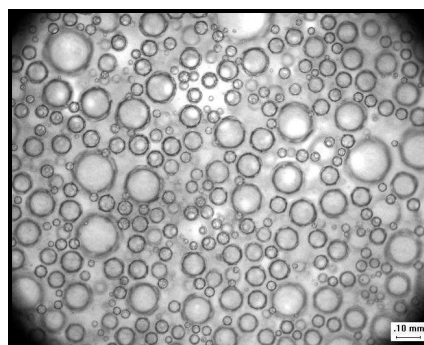
$d_{32}=98 \mu\text{m}$ (3%-native-1600tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=105 \mu\text{m}$ (3%-native-1600tpm-2 bars -30L/60G)



$d_{32}=85 \mu\text{m}$ (3%-80°C-1600tpm-atmosphérique-30L/60G)



$d_{32}=102 \mu\text{m}$ (3%-80°C-1600tpm-2 bars-30L/60G)

Fig. III.59. Evolution de la taille des bulles dans la mousse en fonction de la pression.

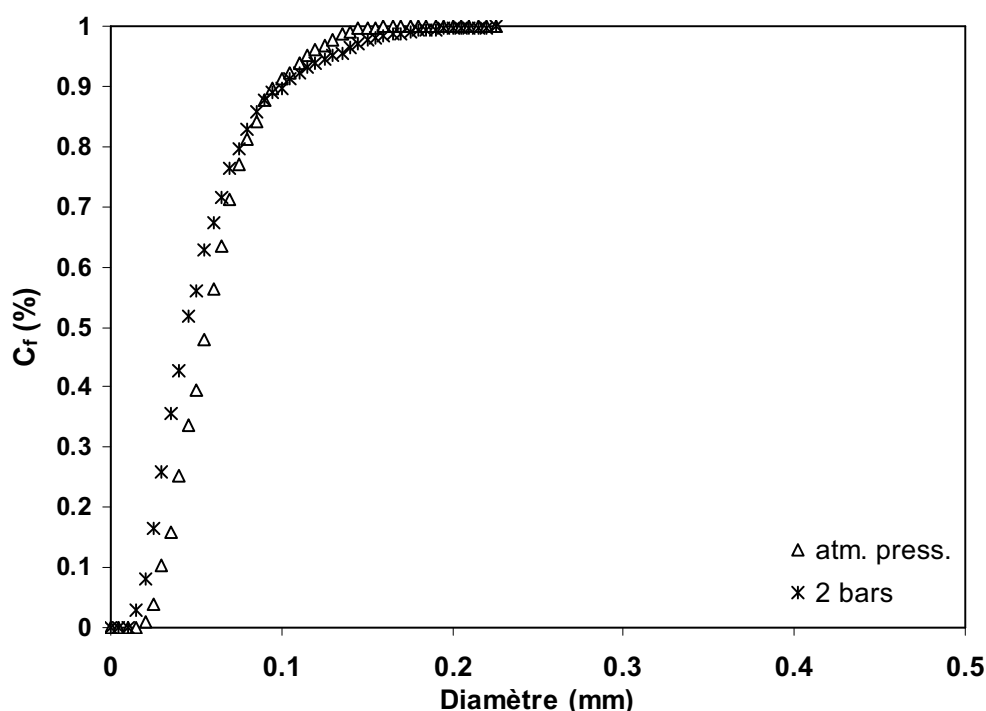


Fig. III.60. Effet de la pression sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (3%-80°C-30L/60G-1600 tpm).

Effet du temps de séjour

Comme précédemment, une diminution du temps de séjour se traduit par une plus grande difficulté à incorporer la totalité du gaz dans la mousse et donc par le phénomène de pistonnage, notamment à faible vitesse d'agitation, aussi bien sous pression atmosphérique qu'à 2 bars, avec ou sans traitement thermique. On notera cependant que la pression semble réduire le pistonnage dans ce cas, ce qui est en accord avec certains résultats expérimentaux de *Labbafi (2006)* obtenus sur une mousse laitière. Cela signifie en pratique que réduire le volume occupé par le gaz par compression permet de réduire la durée du traitement mécanique nécessaire à le disperser.

Lorsque l'influence du temps de séjour sur la distribution des tailles des bulles dans la mousse a été étudiée, les résultats ont démontré que le foisonnement à des temps de séjour plus longs mène à une distribution des tailles de bulles un peu plus uniforme dans les mousses (Figure III.61.) ; cela est surtout lié à la disparition des grosses bulles, alors que les distributions sont

identiques en ce qui concerne les bulles les plus petites sur la figure. On notera que la même tendance avait déjà été observée lors du foisonnement des solutions de WPI sur l'installation rotor-stator. Toutefois, il convient de rappeler qu'ayant travaillé à débits identiques sur les deux unités, les temps de séjour « court » et « long » n'ont pas la même valeur pour les deux installations car les volumes utiles des deux unités diffèrent.

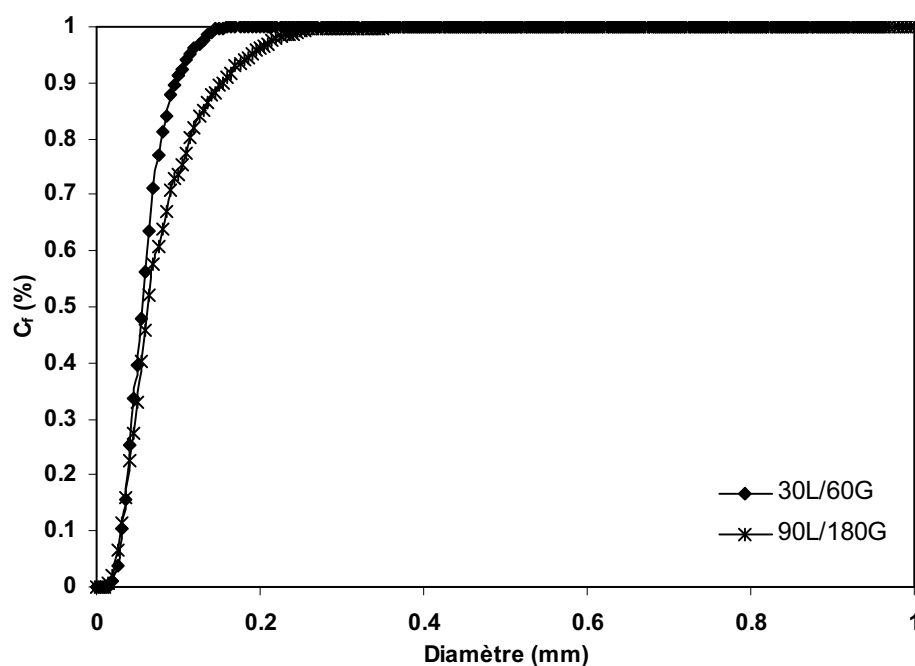


Fig. III.61. Effet du temps de séjour sur la distribution de tailles des bulles dans la mousse (3%-native-1600 tpm).

IV.1.3. Conclusions

En résumé, les résultats obtenus sur la colonne à faible entrefer montrent que cet appareil semble moins efficace que l'unité rotor-stator pour assurer le foisonnement des formulations étudiées. Ils démontrent que le foisonnement y est bien plus sensible à l'influence de la vitesse d'agitation en général, mais aussi un peu plus sensible au traitement thermique du point de vue du taux de foisonnement. En revanche, les effets de la pression, du temps de séjour et même du traitement thermique sur la taille moyenne des bulles y sont beaucoup plus limités, ce qui devrait rendre les variations observées au niveau de la texture et de la stabilité des mousses moins marquées et donc plus difficiles à analyser compte tenu de l'erreur expérimentale.

IV.2. TEXTURE DES MOUSSES

IV.2.1. Effet du traitement thermique

Lors de l'étude de l'impact du traitement thermique sur la texture des mousses fabriquées au moyen de la colonne à faible entrefer, nous n'avons pas observé d'amélioration du G' des mousses à base de WPI dénaturées par rapport à celles produites à partir des WPI natives. Au contraire, pour la plupart des mousses formées à partir des solutions de WPI dénaturées, le module élastique G' présente des valeurs de plus en plus faibles comparées aux protéines natives quand N augmente. Ce résultat est illustré par la Figure III.62. La figure fait toutefois apparaître une exception dans le cas des mousses obtenues à partir des WPI dénaturées à 80°C lorsque le foisonnement a été conduit à une vitesse d'agitation de 1600 tpm ; dans ce cas, il n'y a pas de différence significative entre protéines natives et traitées thermiquement.

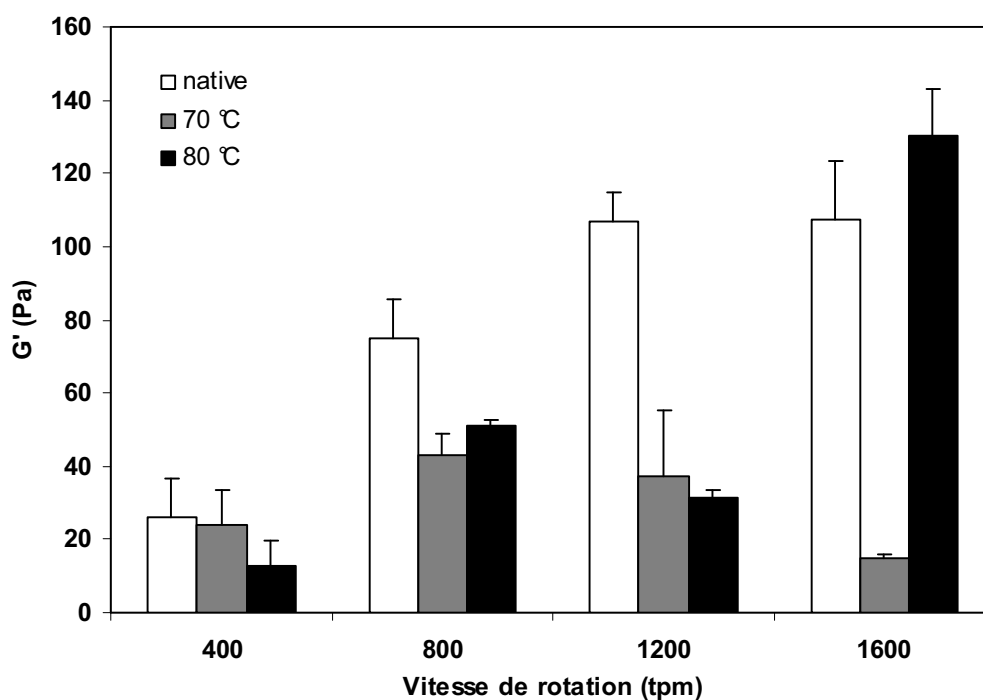


Fig. III.62. Effet du traitement thermique sur la texture de la mousse (3%-30L/60G et pression atmosphérique).

Ce résultat était partiellement prévisible ; en effet, l'augmentation de G' suite à un traitement thermique résultait en grande partie de la diminution de d_{32} pour l'unité rotor-stator. La faible évolution de d_{32} observée précédemment pour la colonne à faible entrefer, voire le fait que d_{32} augmente parfois suite au traitement, ne permettait pas d'espérer une texture de mousse plus ferme, ce qui confirme l'impact de la technologie utilisée sur la texture des mousses formées

IV.2.2. Influence des conditions opératoires

Influence de la vitesse d'agitation et de la pression

En ce qui concerne l'effet de la vitesse d'agitation lors du foisonnement sur la colonne à faible entrefer, nous avons mis en évidence une amélioration de la texture des mousses avec l'augmentation de la vitesse sur la formulation contenant des protéines natives ou dénaturées à 80°C, comme attendu (Figure III.63.). En effet, un écart significatif a été observé entre les G' des mousses produites à une vitesse de 400 tpm et celles foisonnées à 1600 tpm. Comme pour l'unité rotor-stator (Figure III.47.), cet effet semble lié à la diminution de d_{32} lorsque N augmente (Figure III.58.). Ces résultats semblent confirmés sur la Figure III.63. lors du foisonnement sous pression, bien que l'augmentation des incertitudes expérimentales rende l'augmentation de G' à 2 bars moins significative qu'à pression atmosphérique.

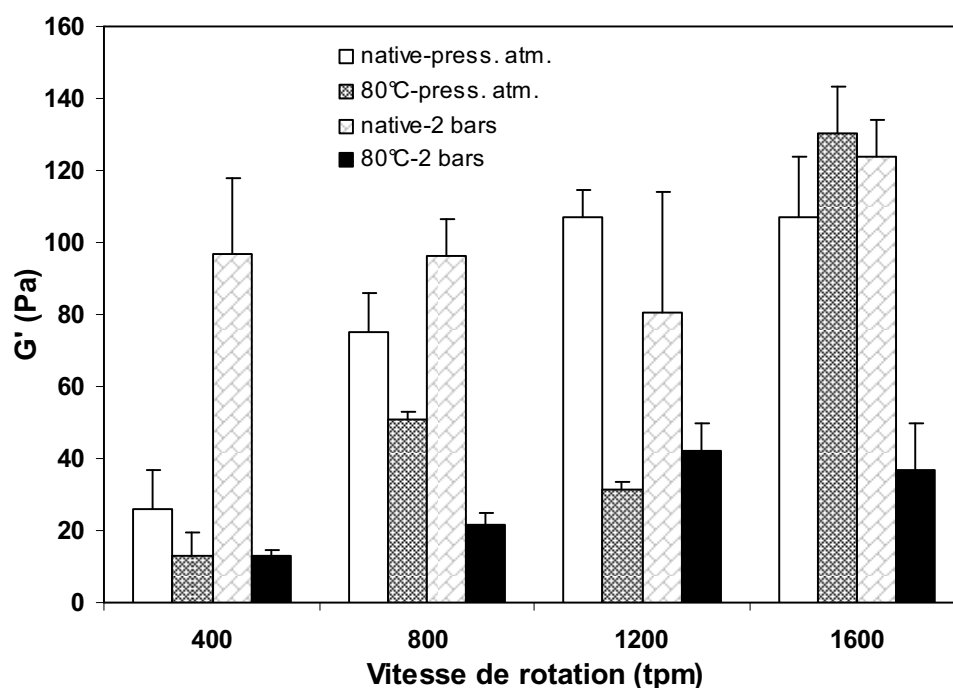


Fig. III.63. Effet de la vitesse d'agitation et de la pression sur la texture de la mousse (3%-30L/60G).

Pour l'effet de la pression, les résultats diffèrent selon le traitement thermique. Travailler à 2 bars semble améliorer la texture pour les protéines natives et, au contraire, la défavoriser après un traitement à 80°C, ce qui diffère des résultats observés sur le rotor-stator. Une raison possible à ce phénomène est que pour la colonne à faible entrefer, le foisonnement s'effectue beaucoup plus près des conditions limites permettant d'atteindre $TF=200\%$. Dans le cas présent, sous pression et avec des protéines traitées thermiquement, on est probablement assez proche de l'apparition du phénomène de pistonage, ce qui aboutirait à des mousses très peu stables suite au traitement thermique. Cette analyse sera confirmée par la suite lors de l'étude de la stabilité des mousses. Toutefois, une étude complémentaire plus approfondie, mettant en jeu plusieurs valeurs de la pression de fonctionnement semble encore nécessaire avant de conclure définitivement sur ce point, sachant que comme cela a été déjà mentionné, les gains résultant d'un travail sous pression restent limités, à la fois sur le taux de foisonnement et sur d_{32} .

Influence du temps de séjour

L'effet du temps de séjour a été étudié lors du foisonnement des solutions de protéines sériques dans la colonne à faible entrefer. Sur la Figure III.64., nous présentons l'évolution de la texture par l'intermédiaire du G' pour des mousses produites à partir des solutions de WPI natives, ainsi que traitées thermiquement à 80°C. En se fondant sur ces résultats expérimentaux, nous avons pu conclure à un effet favorable du temps de séjour le plus long, aussi bien dans le cas des WPI natives que pour celles traitées thermiquement. Celui-ci est plus marqué que pour l'unité rotor-stator, comme le montre une comparaison entre les Figures III.48. et III.49. La plus grande variabilité visible sur la figure à 400 tpm est liée au fait que le pistonnage est parfois observé dans ces conditions. De plus, on rappellera la difficulté et l'incertitude sur les mesures de G' sous pression et à vitesse d'agitation élevée, ce qui peut expliquer en partie les variations de G' observées pour les protéines traitées à 80°C. Globalement, on retiendra que ce sont toujours les protéines natives qui confèrent aux mousses les textures les plus fermes à temps de séjour fixé, indépendamment du fait que celui-ci soit long ou court.

IV.2.3. Conclusions

Globalement, les résultats obtenus sur la texture des mousses diffèrent assez sensiblement de ceux reportés pour le batteur et l'unité rotor-stator, comme cela avait été pressenti suite à l'étude de la microstructure des mousses. Seule la vitesse d'agitation semble avoir un effet similaire qui conduit à une amélioration de G' si N augmente. En revanche, augmenter le temps de séjour améliore plus nettement G' et le traitement thermique à 80°C semble avoir un effet opposé à celui qui était attendu, ce qui confirme l'influence déterminante des facteurs technologiques. En particulier, le fait que le traitement thermique rende le foisonnement plus difficile en termes de taux de foisonnement maximal accessible semble bien plus critique sur la colonne à faible entrefer que sur l'unité rotor-stator, probablement parce que les objectifs recherchés ($TF=200\%$) sont beaucoup plus proches des limites de cette technologie.

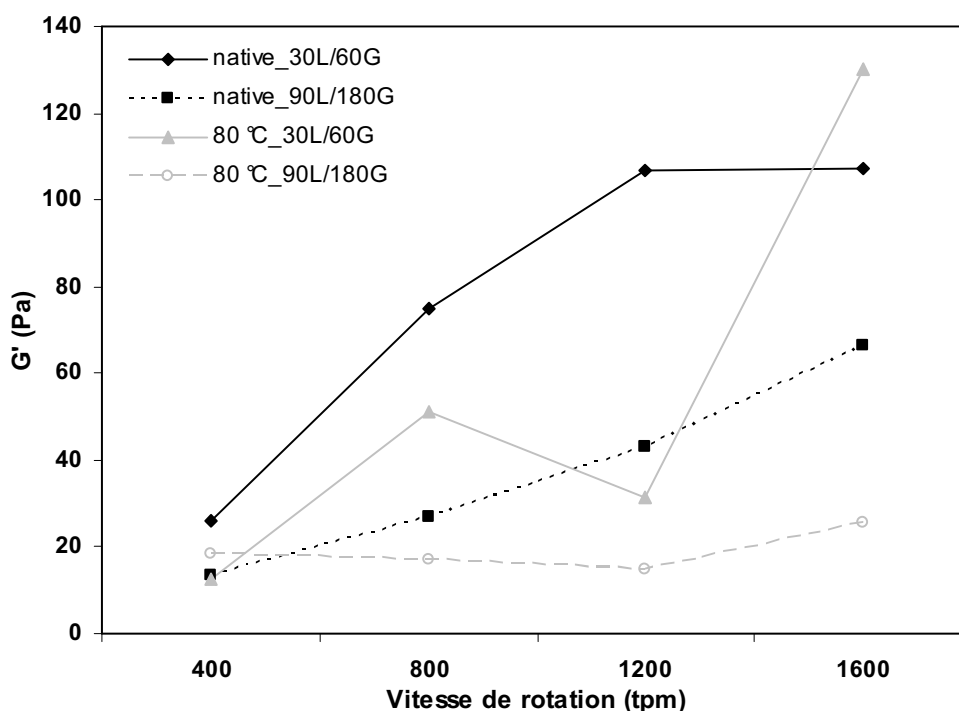


Fig. III.64. Effet du temps de séjour sur la texture de la mousse (3%-pression atmosphérique).

IV.3. STABILITE DES MOUSSES

IV.3.1. Stabilité à court terme (3 h)

Sur la Figure III.65., nous présentons l'évolution de la stabilité à court terme des mousses face au drainage. En s'appuyant sur les résultats expérimentaux présentés sur cette figure, nous pouvons établir deux principaux résultats concernant l'effet de la dénaturation des protéines par la chaleur :

- lorsque le foisonnement est conduit sur la colonne à faible entrefer, l'amélioration de la stabilisation des mousses par les protéines sériques dénaturées est observée sous pression atmosphérique, mais elle est moins importante que sur l'installation de type rotor-stator (Figure III.50.) ;
- lorsque les protéines sériques dénaturées à une température de 80°C sont foisonnées sous 2 bars, les mousses se montrent encore moins stables que lorsque le foisonnement a été effectué sur des protéines natives et à pression atmosphérique. En effet, lors de la déstabilisation des

mousses obtenues par foisonnement sous pression des solutions dénaturées à 80°C, nous n'avons pas observé de plateau, contrairement à tous les autres échantillons, le drainage ayant commencé immédiatement après la préparation des échantillons et s'achevant par un effondrement total de la mousse.

Globalement, ce dernier résultat explique en grande partie les données obtenues dans la section précédente sur l'évolution de G' en fonction de la pression de fonctionnement et du traitement thermique : la diminution de G' résulte vraisemblablement d'un défaut de stabilité de la mousse. Comme expliqué précédemment, la mousse formée dans ce cas est probablement très proche des conditions de pistonnage avec la colonne à faible entrefer, en partie à cause de la pression qui favorise le pistonnage, mais aussi en partie à cause du traitement thermique qui rend les taux de foisonnement élevés plus difficilement accessibles. Le drainage immédiat de certaines mousses modifie donc la rhéologie de ces dernières pendant la mesure, rendant les valeurs de G' peu pertinentes.

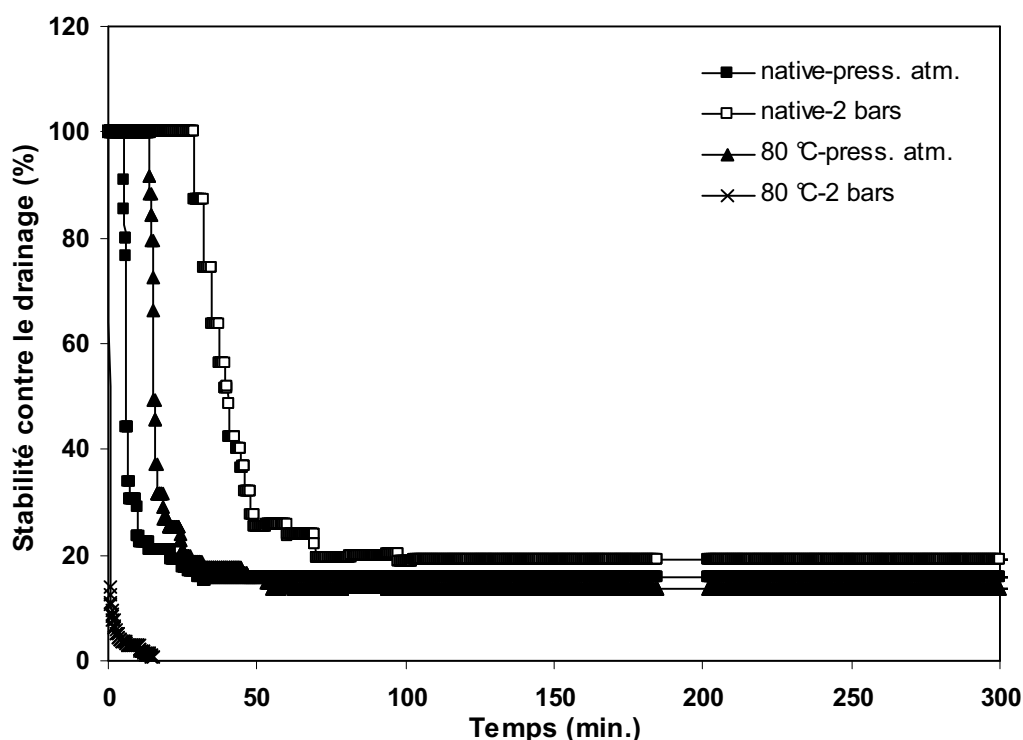


Fig. III.65. Effet du traitement thermique et de la pression sur la stabilité à court terme de la mousse (3%-30L/60G-1600 tpm).

IV.3.2. Stabilité à long terme des mousses (72 h)

Effet du traitement thermique

Lors de l'étude de l'évolution de la stabilité à long terme des mousses produites à partir des solutions de WPI natives et des solutions protéiques dénaturées par la chaleur, nous nous sommes aperçus qu'un traitement thermique à 80°C n'a pas d'effet significatif sur l'effondrement des mousses, tandis qu'un traitement thermique à 70°C se montre en apparence défavorable (Figure III.66.). Ainsi, dans le cas des mousses produites à partir des solutions de WPI dénaturées par la chaleur à 70°C, la diminution de la hauteur de mousse est beaucoup plus rapide et elle débute d'une façon très brusque. En revanche, après cette période, on atteint un plateau au-delà de 20h et, après 72h, on retrouve la même hauteur de mousse que pour les autres échantillons, aussi bien à base de protéines natives que traitées thermiquement. Ceci signifie cependant qu'une fraction du gaz incorporé dans la mousse n'a pas été stabilisée d'une manière satisfaisante lors du foisonnement et que les protéines dénaturées lors du traitement thermique appliqué à 70°C ne jouent pas un rôle significatif dans le processus de stabilisation du squelette des mousses. A 80°C, c'est vraisemblablement la présence d'agrégats solubles qui permet d'expliquer le fait que la stabilité de la mousse soit supérieure à celle observée à 70°C. Par conséquent, on peut conclure que contrairement à ce qui avait été observé pour l'unité rotor-stator, un traitement thermique des protéines ne permet pas d'améliorer significativement la stabilité à long terme des mousses protéiques lorsque le foisonnement est conduit sur une colonne à faible entrefer, ce qui est globalement en accord avec l'ensemble des résultats précédents sur la microstructure et la texture des mousses formées au moyen de cet appareil.

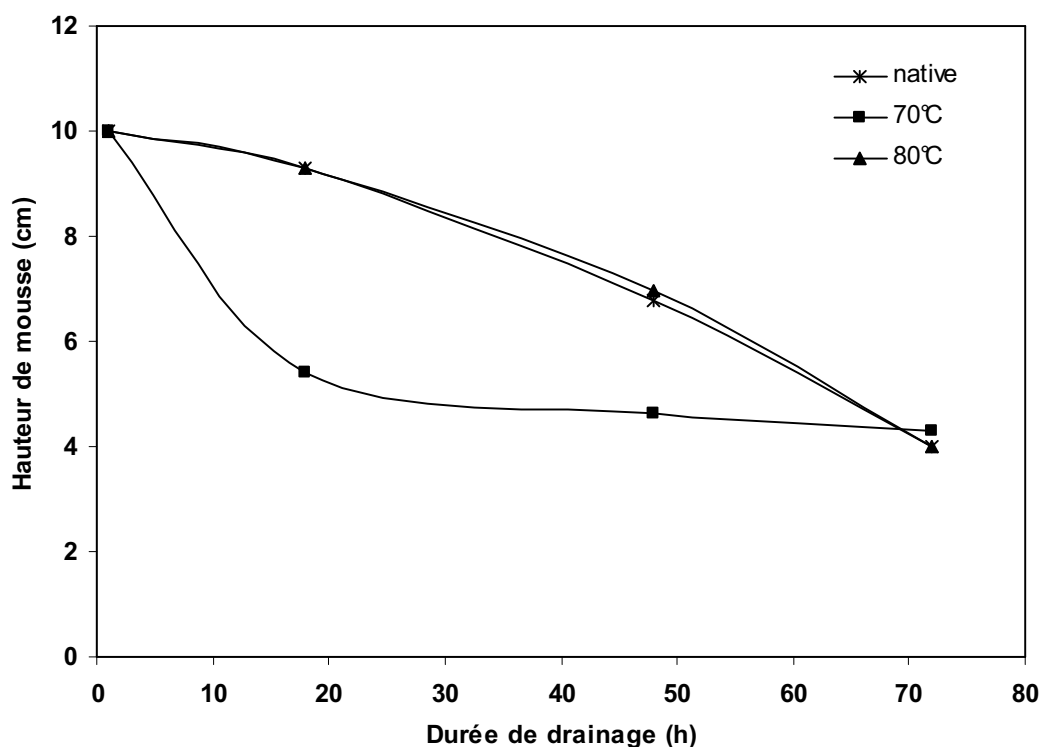


Fig. III.66. Effet du traitement thermique sur la stabilité à long terme de la mousse (3%-30L/60G-atmosphérique-1600 tpm).

Effet de la vitesse d'agitation

Lors de notre étude, nous avons également étudié l'effet de la vitesse d'agitation sur la stabilité à long terme des mousses produites en continu dans la colonne à faible entrefer (Figure III.67.). En se basant sur les résultats expérimentaux présentés sur la Figure III.67., nous pouvons affirmer que la vitesse d'agitation joue sans aucun doute un rôle positif sur la stabilité à long terme des mousses. En effet, une différence significative de la hauteur de mousse a été observée au bout de 48h lorsque la vitesse d'agitation a été augmentée de 400 tpm à 800 tpm. Au-delà, l'effet de la vitesse d'agitation est moins significatif. La Figure III.67. confirme également qu'il n'y a pas d'amélioration significative de la stabilité liée au traitement thermique, les résultats à 400 tpm provenant plutôt du fait que le taux de foisonnement cible n'est pas atteint.

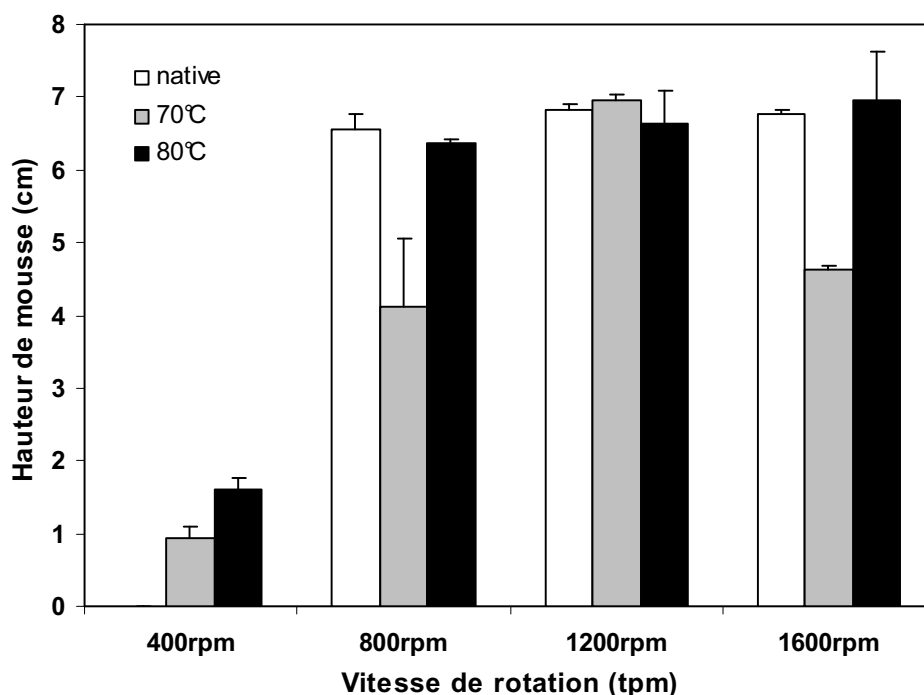


Fig. III.67. Effet du traitement thermique et de la vitesse d'agitation sur la stabilité de la mousse après 48h (3%-30L/60G-atmosphérique).

Effet de la pression

Sur la Figure III.68., nous présentons l'impact de la pression sur la stabilité à long terme d'une mousse produite à partir d'une solution à 3% de WPI lorsque le foisonnement a été conduit à un temps de séjour long et à une vitesse d'agitation de 1600 tpm. Les résultats confirment que la pression réduit la stabilité des mousses contre l'effondrement aux temps courts, puisque celles-ci s'effondrent plus vite que celles formées sous pression atmosphérique. Toutefois, le traitement thermique conserve un effet favorable sur la stabilité à long terme des mousses, notamment lorsqu'une pression a été appliquée lors du foisonnement. En effet, nous avons démontré que, dans ce cas, le drainage de la mousse (mesuré par la masse de liquide drainé) est quasiment immédiat (Figure III.65.) ; rapidement, seul un squelette de mousse sèche persiste, mais ce dernier semble très stable, comme le montre la Figure III.68. Globalement, ce résultat confirme que le traitement thermique améliore la capacité des protéines à stabiliser des mousses sèches, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment au moyen d'un batteur ménager. En revanche, dans le cas général, pour les mousses humides, lorsque drainage et effondrement ont

lieu simultanément, l'effet du traitement thermique sur les protéines peut être masqué par l'influence de la microstructure de la mousse qui dépend fortement des conditions opératoires et de la technologie mises en œuvre pour produire la mousse, ce qui constitue le cas le plus courant dans cette section.

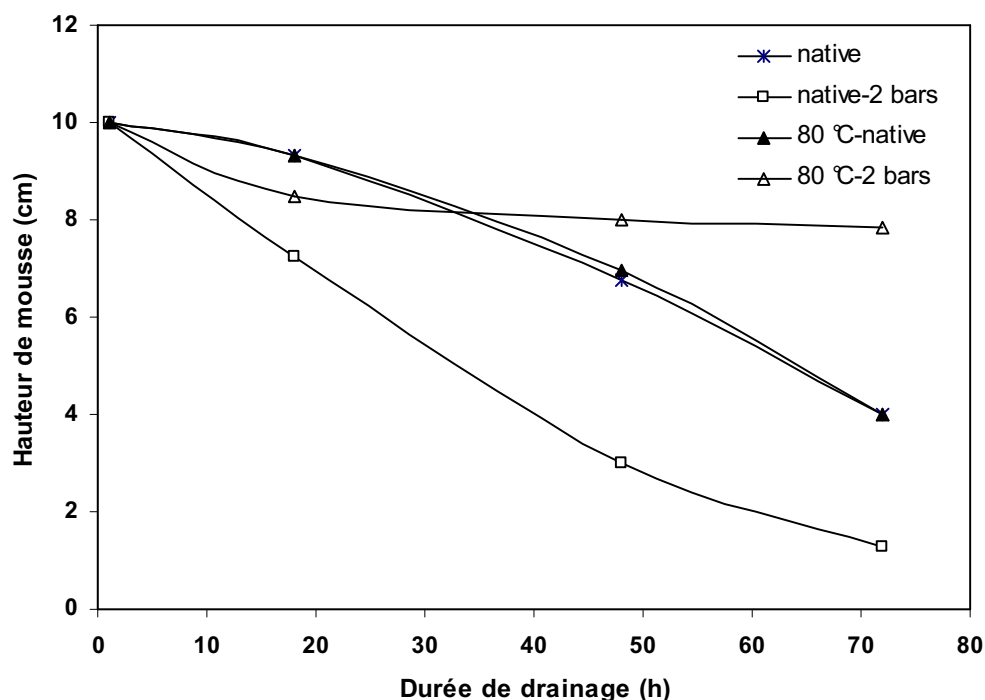


Fig. III.68. Effet de la pression sur la stabilité à long terme de la mousse (3%-30L/60G-1600 tpm).

Effet du temps de séjour

Sur la Figure III.69., nous présentons l'effet du temps de séjour sur la stabilité à long terme d'une mousse produite à partir d'une solution de 3% de WPI lorsque le foisonnement a été conduit à une vitesse d'agitation de 1600 tpm. Les résultats expérimentaux montrent paradoxalement que lorsque le foisonnement est conduit à un temps de séjour plus long avec la colonne à faible entrefer, au-delà de 20h de déstabilisation, les mousses ont tendance à s'effondrer plus rapidement pour les temps de séjour les plus longs. Comme précédemment, cela semble lié au fait que pour les temps de séjour courts, le liquide draine plus vite et qu'il se forme plus rapidement un squelette de mousse sèche, plus stable que pour les mousses humides.

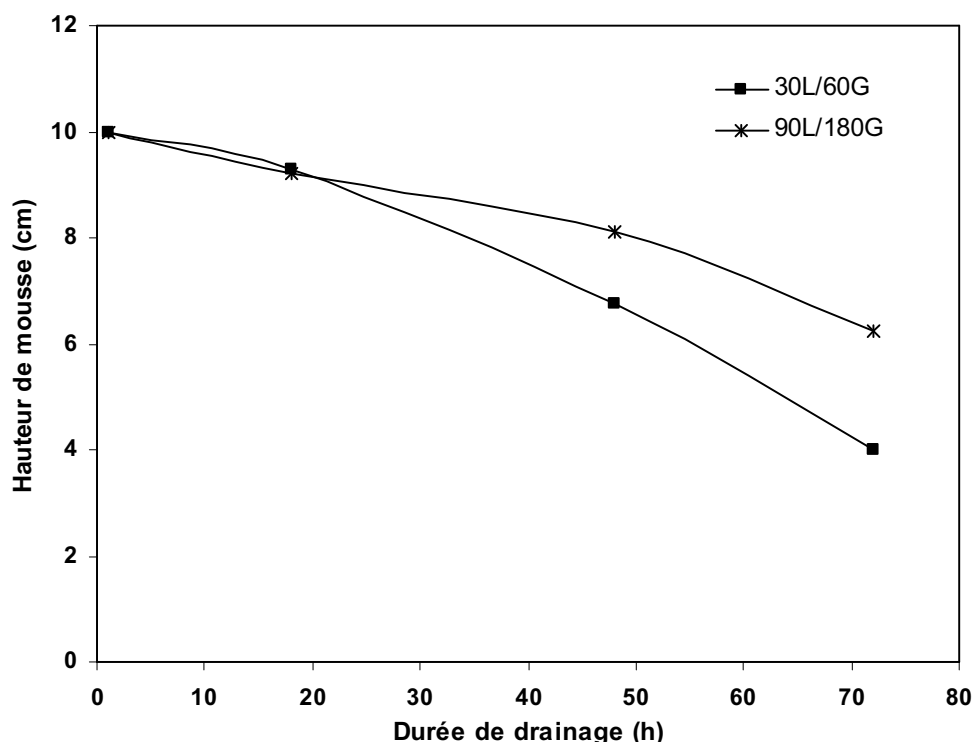


Fig. III.69. Effet du temps de séjour sur la stabilité à long terme de la mousse (3%-native-atmosphérique-1600 tpm).

IV.3.3. Conclusions

Contrairement à ce qui avait été observé précédemment pour l'unité rotor-stator, la relation entre la stabilité des mousses et le traitement thermique est plus complexe dans le cas de la colonne à faible entrefer. Cela provient en grande partie du fait que la réduction de taille des bulles suite au traitement thermique et au foisonnement sous pression n'est plus observée pour la technologie utilisée dans ce travail. Seul subsiste l'effet de la vitesse d'agitation sur d_{32} et sur la stabilité. En pratique, le traitement thermique semble conduire à une meilleure stabilisation des mousses pour lesquelles le drainage est bien plus rapide que l'effondrement et qui forment rapidement des mousses sèches. En revanche, dans le cas général, ce phénomène est masqué et aucune amélioration apparente n'est observée. Cela conduit au paradoxe suivant : suite au traitement thermique, ce sont les conditions opératoires qui conduisent au drainage le plus rapide du liquide qui donnent les mousses qui résistent le mieux à l'effondrement : i.e. un temps

de séjour court et une pression de fonctionnement de 2 bars. En fin de compte, cela confirme très clairement le rôle clef de la technologie utilisée pour juger l'évolution des propriétés des protéines en fonction du traitement thermique appliqué en amont du foisonnement.

IV.4. CONCLUSIONS SUR LE FOISONNEMENT EN CONTINU

Les résultats obtenus dans ce sous-chapitre confirment que la technologie mise en œuvre joue un rôle clef sur le foisonnement en continu et donc aussi sur les conclusions que l'on peut tirer concernant les effets des conditions opératoires ou bien de l'intensité du traitement thermique. Globalement, on retiendra que les performances de la colonne à faible entrefer sont moins bonnes que celles de l'unité rotor-stator pour le produit étudié et les objectifs recherchés. En plus de la distinction continu/discontinu pour le battage, un critère supplémentaire, presque toujours ignoré, doit donc être pris en compte. Pour la colonne à faible entrefer, atteindre le taux de foisonnement est plus difficile suite au traitement thermique, ce qui se traduit par le fait que la pression et le traitement thermique ne permettent plus de diminuer d_{32} . Seule la vitesse d'agitation conserve un rôle prépondérant, encore plus sensible que pour l'unité rotor-stator. Les mousses formées sont donc moins stables et leur texture est donc encore plus difficile à estimer par mesure rhéologique, par exemple dès que le traitement thermique est associé à un autre facteur favorisant la déstabilisation, par exemple la pression. Toutefois, grâce aux résultats expérimentaux, nous avons tout de même pu démontrer que le traitement thermique à 80°C permet d'obtenir des films plus résistants aux interfaces, probablement grâce à la formation d'agrégats solubles, mais que cet effet améliore uniquement la stabilité des mousses humides qui deviennent rapidement des mousses sèches par drainage, alors qu'il est masqué sur les mousses humides de stabilité intermédiaire. Enfin, cela démontre clairement le couplage entre formulation et procédé, c'est-à-dire le fait que la capacité des protéines traitées thermiquement à stabiliser les mousses dépend fortement de la technologie et des conditions opératoires utilisées, ainsi que de la microstructure que celles-ci permettent de conférer aux mousses.

Conclusion

Générale

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail nous a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence la modification des propriétés des solutions de WPI en fonction de la force ionique et de la température du traitement thermique dynamique effectué dans un échangeur de chaleur. L'impact de ces deux paramètres principaux a pu ensuite être évalué grâce à une caractérisation complète de la solution protéique par le biais de techniques telles que la DSC, la DLS, la SEC, l'électrophorèse SDS-PAGE, la microscopie optique et à force atomique. Enfin, nous avons mis en évidence comment les modifications observées sur les protéines affectent leur capacité à former des mousses et à les stabiliser. Les principaux résultats obtenus peuvent être résumés comme suit.

Formation et caractérisation des assemblages des WPI

✓ Force ionique

Par le biais de notre étude, nous avons pu démontrer que la force ionique joue un rôle clef dans le processus de dénaturation et d'agrégation des protéines sériques lors d'un traitement par la chaleur en conditions dynamiques. En effet, nous avons pu conclure que le degré de dénaturation des protéines sériques est fortement réduit en présence d'une force ionique élevée (à savoir à 100 mM NaCl) et que ceci est accompagné de la formation d'agrégats solubles de taille beaucoup plus petite que lors d'un traitement thermique à faible force ionique. Par ailleurs, des analyses par SEC ont confirmé que la présence d'une force ionique élevée favorise la formation d'agrégats solubles lors d'un traitement par la chaleur en conditions dynamiques.

✓ Température

Dans ce travail, nous avons appliqué un traitement thermique dans une gamme de température comprise entre 70 et 100°C afin de produire des agrégats de protéines sériques. Les résultats obtenus ont démontré que la température de traitement thermique joue un rôle primordial lors de la formation des assemblages protéiques. En effet, une dénaturation significative des

protéines sériques a été observée lors du traitement des solutions de WPI à 80°C et elle est presque complète pour des températures de dénaturation supérieures ou égales à 90°C. Nous avons également remarqué que l'augmentation de l'intensité du traitement thermique favorise d'abord la polymérisation des protéines sous forme d'oligomères qui forment seulement par la suite des agrégats solubles ; l'augmentation de la fraction d'agrégats soluble est donc continue et elle suit celle de la température du traitement thermique des solutions de WPI. La formation de gros agrégats insolubles correspond donc à l'agrégation d'assemblages protéiques solubles déjà formés sous l'effet du traitement thermique. La microscopie optique nous a permis de constater que ces derniers sont denses, très irréguliers et fortement ramifiés. Contrairement aux agrégats solubles, la formation de la fraction insoluble semble passer par un maximum à une température de 90°C. Cela concerne à la fois la quantité, mais aussi et surtout la taille des agrégats insolubles. En effet, les assemblages protéiques produits lors du traitement par chaleur à 90°C présentent des tailles près de dix fois supérieures à celles observées lors de traitements à 80°C ou 100°C. En revanche, des températures supérieures à 90°C favorisent plutôt la formation de nouveaux polymères protéiques solubles que l'agrégation des agrégats déjà présents dans la solution. Ces résultats expérimentaux sont importants d'un point de vue pratique puisqu'ils nous ont permis de démontrer que les quantités d'agrégats solubles et insolubles formés peuvent être contrôlées à partir de la température appliquée lors du traitement thermique des solutions de WPI.

Concernant les agrégats solubles, par le biais de la microscopie à force atomique, nous avons pu constater une différence significative au niveau de l'étalement et la formation du film sur un support hydrophobe et sur un support hydrophile. En effet, lorsque l'échantillon de WPI est déposé sur le mica hydrophile, un étalement important a été observé, avec la formation d'un film homogène de petits objets, alors que le dépôt de la solution de WPI sur le graphite hydrophobe conduit à un étalement moins efficace et les agrégats restent bien individualisés. Ce résultat, couplé à ceux obtenus par SDS-PAGE, nous a permis de démontrer que le traitement thermique provoque la formation d'assemblages protéiques primaires associés principalement par des ponts disulfures, qui se réassocient sous forme de structures plus grosses stabilisées probablement par des liaisons hydrophobes.

Impact des assemblages protéiques sur les propriétés des produits foisonnés

✓ *Mousses produites par bullage (mousses humides avec $TF \approx 400\%$)*

Le processus de formation de la mousse s'est montré très dépendant du traitement thermique appliqué aux solutions protéiques. Par exemple, nous avons démontré que le temps de bullage est directement corrélé au pourcentage d'agrégats insolubles et que c'est pour un traitement thermique à 90°C qu'une augmentation significative de la proportion d'agrégats insolubles retarde le plus la formation de la mousse. Ainsi, nous avons pu supposer l'existence de deux régimes différents de formation de la mousse par bullage : le premier, commun à toutes les solutions protéiques est attribué aux monomères de protéines, tandis que le second régime est spécifique aux solutions traitées thermiquement et peut être attribué aux agrégats protéiques. Dans les conditions choisies, le premier régime prévaut au début du bullage et se maintient jusqu'à la fin de celui-ci seulement pour les solutions de WPI natives/70°C, ce qui conduit à des mousses sèches. Suite à un traitement thermique à 80°C ou plus, une bifurcation apparaît au cours du bullage, conduisant au second régime, ce qui a pour conséquence la formation de mousses humides avec un taux de foisonnement plus faible. Par conséquent, ce travail a clairement montré que les propriétés moussantes des protéines sériques ne sont pas affaiblies si l'obtention des mousses humides contenant une proportion maximale de 5% agrégats insolubles constitue le but recherché.

Dans ce travail, nous avons également étudié l'effet individuel de chaque fraction protéique sur la stabilité des mousses. Ainsi, lors de la déstabilisation des mousses produites par bullage, nous avons démontré que les monomères de β -Lg et d' α -La jouent un rôle crucial au début de la formation de la mousse, que les agrégats solubles semblent jouer seulement un rôle secondaire, alors que l'augmentation continue de la fraction insoluble se montre néfaste à la stabilité des mousses.

✓ *Mousses produites par battage (mousses sèches avec $TF \approx 900\%$)*

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des ingrédients lors de la production des mousses de protéines par battage et les résultats issus d'un plan d'expériences ont confirmé que l'augmentation de la concentration en protéines et celle de la force ionique améliorent fortement le taux de foisonnement, alors que la présence de sucre le diminue. Par la même occasion, nous avons pu confirmer l'effet positif des trois paramètres (concentrations en WPI et en sucre, force ionique) sur la stabilité et la texture de la mousse, puisqu'une amélioration sensible de la stabilité et une augmentation du module élastique (G') ont pu être observées.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet combiné « force ionique-température de dénaturation ». Nous avons ainsi démontré que le traitement thermique ($T=100^{\circ}\text{C}$) et la force ionique (0, 50 et 100 mM) jouent un rôle important sur les phénomènes de dénaturation et d'agrégation des protéines, ainsi que sur la durée de vie et la texture des mousses protéiques. En effet, à taux de foisonnement constant, ce qui est quasiment le cas dans nos expériences, nous avons mis en évidence le rôle clef des agrégats protéiques solubles puisque la rigidité et la stabilité des mousses produites à partir des solutions dénaturées sont améliorées par rapport aux mousses formées à partir de solutions natives. Toutefois, nos résultats ont aussi mis en évidence que le traitement thermique, en l'absence aussi bien qu'en présence de sel, n'améliore pas le taux de foisonnement. Enfin, nous avons pu constater que la stabilité des mousses contre le drainage dépend également assez fortement de la maîtrise de la proportion d'agrégats solubles et qu'il existe un optimum de stabilité assurant à la fois une plus grande fermeté et une meilleure stabilité dans le temps. En effet, passer d'une proportion de 8% w/w (cas du traitement thermique sans sel) à une proportion de 70% w/w agrégats solubles (cas du traitement thermique en présence de 50 mM NaCl) conduit à une forte amélioration de la fermeté, mais également à une déstabilisation plus rapide des mousses, alors que l'on améliore à la fois la texture et la stabilité lorsque la proportion des agrégats solubles est de 17% w/w (100 mM NaCl).

Dans un troisième temps, nous avons également étudié l'effet de la température de dénaturation seule (entre 70 et 100°C) lors de la production des mousses par battage et les résultats obtenus nous ont permis de vérifier que le taux de foisonnement de la mousse est très peu sensible au traitement thermique et qu'il diminue légèrement dans le cas de la solution de WPI traitée à 100°C . A contrario, l'élasticité de la mousse a doublé pour des températures de traitement thermique supérieures ou égales à 80°C , ce qui a confirmé le rôle essentiel des agrégats solubles sur la fermeté et la rigidité des mousses stabilisées par des protéines sériques. De même, le rôle clef des agrégats solubles sur la stabilité des mousses contre le drainage a également été confirmé. Un résultat majeur que nous avons mis en évidence est l'existence d'une proportion optimale d'agrégats solubles (environ 10% w/w) qui permet à la fois de maintenir le taux de foisonnement, de diminuer le diamètre moyen des bulles, ainsi que d'améliorer simultanément la fermeté et la stabilité des mousses.

Finalement, une étude approfondie a été consacrée aux rôles respectifs des fractions soluble et insoluble sur les propriétés physico-chimiques des mousses. Nos données ont montré que les agrégats solubles ont un effet positif non seulement sur la stabilisation des mousses, mais

aussi sur leur formation, alors que la fraction insoluble a un effet néfaste à la fois sur la formation et sur la stabilité des mousses. En effet, nos données expérimentales ont confirmé que la présence des agrégats solubles (dont la taille est voisine de 200 nm) conduit à des mousses qui drainent plus lentement. A contrario, il est apparu que les agrégats insolubles favorisent un démarrage plus rapide du drainage.

Néanmoins, le procédé de foisonnement en batch comporte d'importantes limitations technologiques. Le taux de foisonnement et la taille de bulles, en particulier, ne sont pas contrôlés, alors que la structure de la mousse conditionne fortement ses propriétés. Pour s'affranchir de ces contraintes et vérifier la validité des précédents résultats en travaillant à un TF applicable aux mousses laitières d'environ 200%, il a donc été proposé de travailler avec deux procédés en continu, à savoir une unité de type rotor-stator à dents et la colonne à faible entrefer.

✓ *Mousses produites en continu sur une installation de type rotor-stator*

Le foisonnement en continu dans une unité rotor-stator nous a permis de mettre en évidence le fait que le traitement thermique favorise une diminution du diamètre de Sauter, même si son effet est bien plus faible que ceux des paramètres procédé, i.e. la vitesse d'agitation et la pression de fonctionnement. Un traitement thermique à 80°C ou plus semble améliorer la texture des mousses en augmentant leur rigidité (G'), mais cet effet est moins marqué qu'en batteur ménager. En revanche, la stabilité des mousses dans le temps reste essentiellement gouvernée par l'état de dénaturation et d'agrégation des protéines, les conditions opératoires ne jouant ici qu'un rôle secondaire dès qu'un traitement thermique à 80°C ou plus mais avec une limite de T°C est appliqué en amont aux solutions de WPI.

✓ *Mousses produites en continu sur une colonne à faible entrefer*

Si, pour le rotor-stator, l'efficacité de la technologie en regard de l'objectif recherché (TF=200%) permettait de compenser la diminution d'aptitude des protéines à former des mousses, cela ne semble plus être totalement le cas pour la colonne à faible entrefer. Une augmentation de la vitesse d'agitation a donc été nécessaire afin de maintenir le taux de foisonnement à sa valeur cible suite à un traitement thermique et cela se traduit par le fait qu'à vitesse fixée, on n'observe plus de diminution significative du diamètre de Sauter après traitement thermique, ce qui rend les variations observées au niveau de la texture et de la stabilité des mousses moins nettes et donc plus difficiles à analyser compte tenu de l'erreur expérimentale. Seule la vitesse d'agitation semble avoir un effet similaire à celui observé pour

le rotor-stator, conduisant à une amélioration de G' lorsque N augmente. En revanche, augmenter le temps de séjour améliore plus nettement G' et le traitement thermique à 80°C semble avoir un effet opposé à celui qui était attendu, ce qui confirme l'influence déterminante des facteurs technologiques. En conséquence, la relation entre la stabilité des mousses et le traitement thermique est plus complexe dans le cas de la colonne à faible entrefer. Cela provient également du fait qu'une réduction de taille des bulles suite au traitement thermique et au foisonnement sous pression n'est plus observée pour cette technologie, contrairement au rotor-stator. Seul subsiste l'effet positif de la vitesse d'agitation sur la stabilité. Pour la colonne à faible entrefer, le traitement thermique semble conduire en pratique à une meilleure stabilisation des mousses pour lesquelles le drainage est bien plus rapide que l'effondrement et qui forment rapidement des mousses sèches. En revanche, dans le cas général, ce phénomène est resté masqué et aucune amélioration apparente n'a été observée.

Perspectives

PERSPECTIVES

Cette étude a contribué à la compréhension de l'effet du traitement thermique sur les propriétés physico-chimiques des solutions de protéines sériques et des mécanismes de formation des mousses stabilisées par des assemblages protéiques. Nous avons ainsi montré qu'en couplant traitement thermique dynamique et formulation, il est possible de générer des agrégats de lactosérum adaptés au foisonnement en discontinu. En faisant varier principalement la composition du milieu et la température de traitement thermique, nous avons produit des agrégats de taille et structure diverses en proportions variables qui présentent des propriétés différentes ; celles-ci pourront être par exemple mises à profit afin de produire des mousses allégées en matière grasse. Il faut cependant noter que, malgré les résultats acquis par ce travail, ainsi que ceux que l'on peut recenser dans l'abondante littérature disponible sur la dénaturation et l'agrégation des protéines sériques, de nombreux points restent encore obscurs, notamment lorsque des WPI ou des WPC sont utilisées en lieu et place de protéines purifiées et lorsqu'un traitement thermique dynamique en échangeur est mis en œuvre.

L'utilisation d'assemblages protéiques afin de stabiliser des mousses allégées en matière grasse est prometteuse, mais elle nécessite encore une étude approfondie au niveau de la formulation, ainsi que pour la détermination du procédé continu le plus adapté. De plus, dans le cadre de la recherche de nouveaux aliments qui répondent à la demande des consommateurs, il est également nécessaire de prendre en compte les aspects « perception visuelle » et surtout organoleptique des produits foisonnés allégés. Ainsi, des analyses sensorielles devraient accompagner les essais portant sur de nouveaux produits. La composante nutritionnelle ne devrait pas être négligée également. De nos jours, les consommateurs s'intéressent de plus en plus à l'apport calorique des aliments. Le remplacement de la matière grasse par des assemblages protéiques pourrait aussi avoir un effet bénéfique pour la santé, mais encore faut-il que la durée de vie du produit soit satisfaisante, d'où la complexité de la problématique présentée dans le cadre de notre étude.

Concernant la recherche fondamentale, certains aspects nécessitent encore notre attention :

- ✓ il serait fort intéressant d'étudier les changements de conformation moléculaire que subissent les polymères lors de leur interaction associative ; en particulier, les méthodes de spectroscopie infrarouge et de dichroïsme circulaire semblent capables de fournir des informations complémentaires sur la structure tertiaire des protéines.
- ✓ afin de mieux appréhender l'impact du traitement par la chaleur lors de la génération d'assemblages protéiques, une étude du couple temps/température et la comparaison des technologies (plaque vs. tube) serait intéressant à approfondir.
- ✓ l'aspect formulation des produits foisonnés allégés stabilisés par des assemblages protéiques est encore à étudier, notamment le couplage avec la matière grasse.
- ✓ des systèmes de foisonnement en continu autres que le rotor-stator ou la colonne à faible entrefer pourraient en être envisagés, comme par exemple le mélangeur statique. Ce dispositif, utilisé principalement pour le mélange de produits visqueux, pourrait servir à produire des mousses stabilisées par des agrégats protéiques. Il semble en effet prometteur si l'on se réfère à des travaux déjà réalisés au sein du laboratoire sur la production en continu de mousses de blanc d'œuf pour des taux de foisonnement allant jusqu'à 1000%. L'utilisation de mélangeurs statiques pour la production de mousses de protéines sériques présenterait aussi l'intérêt supplémentaire de permettre une comparaison entre l'aération des protéines sériques et celle des protéines de blanc d'œuf et permettrait une meilleure compréhension des mécanismes complexes pilotant le foisonnement.

D'un point de vue fondamental, un approfondissement de l'analyse des résultats obtenus par les méthodes d'étude de la formation et de la déstabilisation des mousses en batch (battage, bullage) est indispensable.

Concernant les développements industriels, on peut s'accorder sur trois applications potentielles :

- ✓ il serait avantageux de trouver un moyen efficace d'obtenir des polymères solubles sous forme de poudre, pour entre autres faciliter leur manipulation et leur conservation. L'utilisation d'un concentré de protéines de lactosérum pour la fabrication des polymères solubles pourrait être envisagée pour diminuer les coûts de production. Une étude des coûts d'utilisation d'un concentré protéique par rapport à un isolat protéique serait nécessaire afin d'estimer l'intérêt d'une telle utilisation.

- ✓ il serait intéressant de poursuivre notre travail avec une étude sur trois matrices différentes contenant des assemblages protéiques :
 - mousses neutres (par exemple la mousse au chocolat) ;
 - mousses acides (par exemple la mousse de yaourt) ;
 - mousses salées (par exemple la mousse au poisson).
- ✓ une étude d'analyse sensorielle est également envisagée pour prédire la perception du consommateur par rapport à ces produits nouveaux.

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Les travaux de recherche effectués durant ces trois années de thèse ont donné lieu à un certain nombre de publications dans des revues internationales et de communications dans des colloques dont la liste est donnée ci-dessous :

Publications dans des Revues Internationales à Comité de Lecture

1. **Nicorescu, I.**, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Combined effect of dynamic heat treatment and ionic strength on denaturation and aggregation of whey proteins-Part I, *Journal of Food Research International*, 41, 707-713. **IF₂₀₀₈= 2.271**
2. **Nicorescu, I.**, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Combined effect of dynamic heat treatment and ionic strength on the properties of whey protein foams-Part II, *Journal of Food Research International*, 41, 980-988. **IF₂₀₀₈=2.271**
3. **Nicorescu, I.**, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2009). Effect of the heat-treatment on the physical properties of whey protein foams, *Food Hydrocolloids*, 23, 1209-1219. **IF₂₀₀₉=2.492**
4. **Nicorescu, I.**, Riaublanc, A., Loisel, C., Vial, C., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2009). Impact of protein self-assemblages on foams properties, *Journal of Food Research International*, in press. **IF₂₀₀₉=2.07**

Communications en conférences avec actes et comité de lecture

1. **Nicorescu, I.***, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2007). Factors determining the physical properties of whey protein foams (2 pages), poster, 1st *International Congress on medical and food foams "Biofoams"*, Capri, Italie.
2. **Nicorescu, I.***, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Influence du traitement thermique et de la force ionique sur les propriétés des mousses à base de protéines sériques, communication orale, *Scientific Study and Research*, IX (3) 365-378.
3. **Nicorescu, I.***, Riaublanc, A., Loisel, C., Vial, C., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2009). Self-assemblages induced by dynamic heat-treatment: their role in foam structuration and stabilization (2 pages), poster, *International Symposium on Food Rheology and Structure*, Zürich, Suisse.

Congrès sans actes

1. **Nicorescu, I.***, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Impact of dynamically heat-induced aggregates on foaming properties of whey proteins, communication orale, *EUFOAM*, Noordwijk, Pays-Bas.
2. **Nicorescu, I.**, Loisel, C., Riaublanc, A., C., Vial, Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J.* (2008). Dynamically heat-induced aggregates. A new alternative in foams formation and its stability? poster, 10th *International Congress of Engineering and Food "ICEF10"*, Vina del Mar, Chile.

3. **Nicorescu, I.***, Loisel, C., Vial, C., Riaublanc, A., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Effet de la durée de battage et de l'addition de sucre sur les propriétés physico-chimiques des mousses laitières, poster, *5^{ème} Congrès de Chimie Appliquée (CoFrRoCa)*, Bacau, Roumanie.
4. **Nicorescu, I.***, Riaublanc, A., Vial, C., Loisel, C., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Morphology and functionality of the self-assemblages induced by dynamic heat-treatment. Impact on foam properties, poster, *EUFOAM*, Noordwijk, Pays-Bas.
5. **Nicorescu, I.***, Loisel, C., Riaublanc, A., Vial, C., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Continuous manufacturing of foams prepared from a mixture of heat-induced protein aggregates and xanthan gum, poster, *22^{ème} Conference of the European Colloid and Interface Society*, Cracow, Poland.
6. **Nicorescu, I.***, Loisel, C., Riaublanc, A., Vial, C., Djelveh, G., Cuvelier, G., Legrand, J. (2008). Could a mixture based on heat-induced aggregates and xanthan gum stabilize no-fat whey foams? poster, *22^{ème} Conference of the European Colloid and Interface Society "ECIS"*, Cracow, Poland.

* Conférencier (Speaker)

— *Références* —

Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adebowale, K.O. & Lawal, O.S. (2003).** Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean (*Mucuna pruriens*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 83, p.237–246.
- Akkermans, C., Van der Goot, A.J., Venema, P., Van der Linden, E., & Boom, R.M. (2008).** Properties of protein fibrils in whey protein isolate solutions: Microstructure, flow behaviour and gelation. *International Dairy Journal*, 18, p.1034–1042.
- Ananthanarayanan, V.S., Ahmad, F., & Bigelow, C.C. (1977).** The denaturation of β -lactoglobulin at pH 2. *Biochimica Biophysica Acta*, 492, p.194–203.
- Antipova, A.S., Semenova, M.G., & Belyakova, L.E. (1999).** Effect of sucrose on the thermodynamic properties of ovalbumin and sodium caseinate in bulk solution and at air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, p.261–270.
- Aymard, P., Gimel, J.C., Nicolai, T., & Durand, D. (1996).** Experimental evidence for a two-step process in the aggregation of β -lactoglobulin at pH 7. *Journal de Chimie Physique*, 93, p.987–997.
- Aymard, P., Durand, D., & Nicolai, T. (1996a).** A comparison of the structure of β -lactoglobulin aggregates formed at pH 7 and pH 2. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 2, p.115–119.
- Babin, P., Della Valle, G., Chiron, H., Cloetens, P., Hoszowska, J., Pernot, P., Réguerre, A.L., Salvo, L., & Dendievel, R. (2006).** Fast X-ray tomography analysis of bubble growth and foam setting during breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 43, p.393–397.
- Balerin, C., Aymard C., DUCEPT, F., Vaslin, S., & Cuvelier, G. (2007).** Effect of formulation and processing factors on the properties of liquid food foams. *Journal of Food Engineering*, 78, p.802–809.
- Bals, A., & Kulozik, U. (2003).** Effect of pre-heating on the foaming properties of whey protein isolate using a membrane foaming apparatus. *International Dairy Journal*, 13, p.903–908.
- Barlow, I.E., Hardham, J.F., & Zadow, J.G. (1984).** Stability of reconstituted whey protein concentrates to ultra-heat treatment processing. *Journal of Food Science*, 49, p.32–33.

- Bastiens, A., Paquot, M., Marbraise, M., & Deroanne, C. (1990).** Capacité moussante des isolats protéiques : influence du potentiel électrocinétique des dispersions protéiques. *Sciences des Aliments*, 10, p.773–783.
- Baussay, K., Le Bon, C., Nicolai, T., Durand, D., & Busnel, J.P. (2004).** Molecular description of the formation and structure of plasticized globular protein films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, p.21–28.
- Bekkour, K., & Lounis, M. (2004).** Etude expérimentale des propriétés rhéologiques de mousses à base de PEO-SDS. *Rhéologie*, vol. 6, p.38–44.
- Beverung, C.J., Radke, C.J., Blanch, H.W. (1999).** Protein adsorption at the oil/water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. *Biophysical Chemistry*, 81 (1), p.59–80.
- Bhakta, A. & Ruckenstein, E. (1997).** Decay of standing foams: drainage, coalescence and collapse. *Advances in Colloids and Interface Science*, 70, p.1–124.
- Bikerman, J. (1973).** *Foams – Applied physics and engineering*. An International Series, Springer-Verlag, New York.
- Bisperink, C.G.J., Ronteltap, A.D., & Prins, A. (1992).** Bubble-size distributions in foams. *Advances in Colloid and Interface Science*, 38, p.13–32.
- Bouaouina H. (2005).** *Etude de l'homogénéisation à très hautes pressions d'émulsions alimentaires*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, p.147.
- Bouaouina, H., Desrumaux, A., Loisel, C., & Legrand, J. (2006).** Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. *International Dairy Journal*, 16, p.275–284.
- Britten, M., & Lavoie, L. (1992).** Foaming properties of protein as affected by concentration. *Journal of Food Science*, 57, p.1219–1222 et 1241.
- Britten, M. (1998).** Heat treatments to improve functional properties of whey proteins. En: *Whey* (p. 189–196). Bruxelles, Belgium: *International Dairy Federation*.
- Brooker, B.E., Anderson, M., Andrews, A.T. (1986).** The development of structure in whipped cream. *Food microstructure*, 5, p. 277–285.
- Brownlow, S., Morais Cabral, J.H., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C., & Sawyer, L. (1997).** Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, p.481–495.
- Bruhn, C.M., & Bruhn, J.C. (1988).** Observations on the whipping characteristics of cream. *Journal of Dairy Science*, 71, p.857–862.

- Bushell, G.C., Yan, Y.D., Woodfield, D., Raper J., & Amal, R. (2002).** On techniques for the measurement of the mass fractal dimension of aggregates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 95, p.1–50.
- Cairolì, S., Iametti, S., & Bonomi, F. (1994).** Reversible and irreversible modifications of β -lactoglobulin upon exposure to heat. *Journal of Protein Chemistry*, 13, p.347–354.
- Campbell, G.M., & Mougeot, E. (1999).** Creation and characterisation of aerated food products. *Trends in Food Science and Technology*, 10, p.283–296.
- Capron, I., Brigand, G. & Muller, G. (1997).** About the native and renatured conformation of xanthan exopolysaccharide. *Polymer*, 38, p.5289–5295.
- Cayot, P. (1989).** *Etude des propriétés de surface des constituants α_s et β de la caséine bovine, purs et en mélange : influence de la glycosylation.* Mémoire de DEA, Université de Bourgogne, France.
- Cayot, P., & Lorient, D. (1998).** *Structures et technofonctions des protéines du lait.* Lavoisier Technique et Documentation, Paris, France.
- Charbonnel, E., Wilde, P.J., & Clark, D.C. (1994).** Preparation and characterization of a model whey protein isolate to determine the contribution of the protein components to functional properties (Poster). *Symposium of Royal Society of Chemistry, Food Chemistry Group: Food Macromolecules and Colloids*, 23-25 mars, Dijon, France.
- Cheftel, J.C., & Lorient, D. (1982).** Les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Le Lait*, 62, p.435–483.
- Clark, D.C. (1995).** Characterization of food. Application of state-of-the-art fluorescence and interferometric techniques to study coalescence in food dispersions. *Emerging Methods*, p.23–57.
- Clark, A.H. (1998).** En *Functional Properties of Food Macromolecules*, 2^{ed}. In: S.E. Hill, Ledward, D.A. et Mitchell, J.R., Editors, *Functional Properties of Food Macromolecules*, Aspen Publishers, Gaithersburg, USA, p.77.
- Clark, A.H., Kavanagh, G.M, & Ross-Murphy, S.B. (2001).** Globular protein gelation – theory and experiment. *Food Hydrocolloids*, 15, p.383–400.
- Closs, B. (1990).** *Influence de la structure sur les propriétés de surface des protéines du lactosérum.* Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, France.
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H., & Creamer, L.K. (2007).** Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, p.1–23.

- Creamer, L.K., Parry, D.A.D., & Malcom, G.N. (1983).** Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227, p.98–105.
- Croguennec, T., Bouhallab, S., Mollé, D., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2003).** Stable monomeric intermediate with exposed Cys-119 is formed during heat denaturation of β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301, p.465–471.
- Croguennec, T., Kennedy, B.T., & Mehra, R. (2004).** Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14, p.399–409.
- Croguennec, T., Renault, A., Bouhallab, S., Pezennec, S. (2006).** Interfacial and foaming properties of sulfhydryl-modified bovine β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302, p.32–39.
- Croguennec, T., Renault, A., Beaufils, S., Dubois, J.J., & Pezennec, S. (2007).** Interfacial properties of heat-treated ovalbumin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 315, p.627–636.
- Damodaran, S. (1989).** Influence of protein conformation on its adaptability under chaotropic conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 11, p.2–8.
- Damodaran, S. (2005).** Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of Food Science*, 70, p.54–66.
- Dannenberg, F. (1986).** *Zur Reaktionskinetik der Molkenproteindenaturierung und deren technologischen Bedeutung*. These de doctorat, Université München-Weihenstephan, Allemagne.
- Davis, J.P., & Foegeding, E.A. (2004).** Foaming and interfacial properties of polymerized whey protein isolate. *Food Chemistry and Toxicology*, 69, p.404–410.
- Davis, J.P., & Foegeding, E.A. (2007).** Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 54, p.200–210.
- de la Fuente, M.A., Singh, H., & Hemar, Y. (2002).** Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 13, p.262–274.
- De Feijter, J.A., & Benjamins, J. (1987).** Adsorption kinetics of proteins at the air–water interface. En: *Food Emulsions and Foams*. Dickinson, E., Ed.: Royal Society of Chemistry, Londres, p.72.
- de Wit, J.N. (1981).** Structure and functional behaviour of whey proteins. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 35, p.47–64.

- de Wit, J.N., & Klarenbeek, G.K. (1981).** A differential scanning calorimetric study of the thermal behaviour of bovine β -lactoglobulin at temperature up to 160°C. *Journal of Dairy Research.*, 48, p.293–302.
- de Wit, J.N., & Hontelez-Backx, E. (1981).** Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum: conséquences des traitements thermiques. *Technique Laitière*, 952, p.19–22.
- de Wit, J.N., & Klarenbeek, G. (1984).** Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 67, p.2701–2710.
- de Wit, J.N., Hontelez-backx, E., & Adamse, M. (1988).** Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 3. Functional properties in aqueous solution. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42, p.155–172.
- Dickinson, E. (1989).** Protein adsorption at liquid interfaces and the relationship to foam stability. En: Wilson A.J. *Foams: physics, chemistry and structure*, Springer Verlag, Londre, p.39–53.
- Dickinson, E. (1992).** An introduction to food colloids. Oxford science publications, Oxford University Press, Oxford. Traduit par Courthadon J.L. et Le Meste M. (1996). *Les colloïdes alimentaires*. Masson, Paris.
- Dickinson, E. (1992a).** Food colloïds – An overview. *Colloïds and Surfaces*, 42, p.191–204.
- Dickinson, E., & McClements, D.J. (1996).** *Advances in Food Colloids*. Londre (Angleterre): Blackie Academic & Professional, p.67.
- Dickinson, E. (1997).** Properties of emulsions stabilized with milk proteins: overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80, p.2607–2619.
- Dickinson, E., & Matia-Merino, L. (2002).** Effect of sugars on the rheological properties of acid caseinate-stabilised emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 16, p.321–331.
- Djelveh, G., Bacati, O. & Gros, J.B. (1995).** Mechanical aspects of gas dispersion in continuous foaming food processes using scraped surface heat exchangers. *Journal of Food Engineering*, 23, p.213–223.
- Djelveh, G., Cornet, J.F., & Gros, J.B. (1999).** Combined effects of substrate and process parameters in food foaming processes. En *Bubbles in food* (éditeurs G.M. Campbell, C. Webb, S. Pandiello & K. Niranjana), p.75–82, Eagan Press, St. Paul (MN), USA.
- Dumitrascu, M.R. (2004).** *Application des propriétés structurales des mousses aqueuses en cristallisation*. Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Durand, D., Gimel, J.C., & Nicolai, T. (2002).** Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins. *Physica A*, 304, p.253–265.

Durian^{web}: <http://www.physics.ucla.edu/~dws/foam.html>

Eisner, M.D., Wildmoser, H., & Windhab, E.J. (2005). Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 263, p.379–362.

Ekserova, D.R., Krugliakov, P.M., & Exerowa, D. (1997). *Foam and Foam Films*. Elsevier Health Sciences, Amsterdam, Pays-Bas.

Galani, D., & Owusu Apentm, R.K.. (1996). The effect of heat on whey proteins. *Food Science and Technology Today*. 10, p.163–168.

Gallart, M., Tomas, X., et al. (2004). Relationship between foam parameters obtained by the gas-sparging method and sensory evaluation of sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, p.127–133.

Gaucheron, F. (2003). *Minéraux et produits laitiers*. Editions Tec & Doc Lavoisier, Paris.

Gekko, K., & Yamagami, K. (1991). Flexibility of food proteins as revealed by compressibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, p.57–62.

German, J.B., O'Neill, T.E., & Kinsella, J.E. (1985). Film forming and foaming behavior of food proteins. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62, p.1358–1366.

Gimel, J.C., Durand, D., & Nicolai, T. (1994). Structure and distribution of aggregates formed after heat induced denaturation of globular proteins. *Macromolecules*, 27, p.583–589.

Gonzales Mendes, N. (1990). *Mise en œuvre d'un procédé de foisonnement en continu dans un échangeur de chaleur à surface raclée. Elaboration de mousses de viande et de poisson*. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Gosal, W.S., & Ross-Murphy, S.B. (2000). Globular protein gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, p.188–194.

Gotham, S.M., Fryer, P.J., & Pritchard, A.M. (1992). β -Lactoglobulin denaturation and aggregation reactions and fouling deposit formation: A DSC study. *International Journal of Food Science and Technology*, 27, p.313–327.

Gràcia-Juliá, A., René, M., Cortés-Muñoz, M., Picart, L., López-Pedemonte, T., Chevalier, D., & Dumay, E. (2008). Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: A comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. *Food Hydrocolloids*, 22, p.1014–1032.

Graham, D., & Philipps, M.C. In : Akers R.J. (1976). *Foams*. Academic Press, New York (USA), p.131.

Grinberg, V.Y., Burova, T.V., Grinberg, N.V., & Mashkevick, A.Y. (1993). *Food proteins, structure and functionality*. Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag, p.40.

- Gunasekaran, S., & Ak, M.M. (2000).** Dynamic oscillatory shear testing of foods—selected applications. *Food Science and Technology*, 11, p.115–127.
- Haedelt, J. (2005).** *An investigation into bubble inclusion into liquid chocolate*. These de doctorat, School of Food Biosciences, University of Reading, Reading.
- Haggett, T. (1976).** The whipping, foaming and gelling properties of whey protein concentrates. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technologie*, 14, p.198.
- Hagolle, N., Relkin, P., Popineau, Y., & Bertrand, D. (2000).** Study of the stability of egg white protein-based foams: effect of heating protein solution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, p.1245–1252.
- Halling, P.J. (1981).** Protein-stabilized foams and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, p.155–203.
- Hambling, S.G., McAlpine, A.S., & Sawyer, L. (1992).** In P. F. Fox (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Vol. 1 (p.140–190). Londre: Elsevier Applied Science.
- Hanselmann, W., & Windhab, E. (1999).** Flow characteristics and modelling of foam generation in a continuous rotor-stator mixer. *Journal of Food Enginnering*, 38, p.393–405.
- Hambling, S.G., Mc Alpine, A.S., & Sawyer, L. (1992).** *β -lactoglobulin*. Londre (Angleterre), Elsevier Applied Science.
- Havea, P., Singh, H., Creamer, L.K., & Campanella, O.H. (1998).** Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. *Journal of Dairy Research*, 65, p.79–91.
- Hepworth, N.J., Hammond, J.R.M., & Varley, J. (2004).** Novel application of computer vision to determine bubble size distributions in beer. *Journal of Food Engeneering*, 61, p.119–124.
- Hill, E.K., Krebs, B., Goodall, D.G., Howlett, G.J., & Dunstan, D.E. (2006).** Shear flow induces amyloid formation by β -lactoglobulin. *Biomacromolecules*, 7, p.10–13.
- Hines, M.E., & Foegeding, E.A. (1993).** Interactions of α -lactalbumin and bovine serum albumin with β -lactoglobulin in thermally induced gelation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, p.341–346.
- Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwasima, K., Sugai, S., & Murai, N. (1980).** α -lactalbumine: a calcium metalloprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95, p.1098–1104.

- Hoffmann, M.A.M., & Vanmil, P.J.J.M. (1997).** Heat-induced aggregation of β -lactoglobuline : role of the free thiol group and disulfide bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, p.2942–2948.
- Höhler, R., Cohen-Addad, S., & Asnacios, A. (1999).** Rheological memory effect in aqueous foam. *Europhysics Letters*, 48, p.93–98.
- Holden, T.F., Aceto, N.C., & Schoppet, E.F. (1964).** Effects of viscosity and temperature on the foaming characteristics of concentrated whole milk. *Journal of Dairy Science*, 47, p.359–364.
- Horozov, T. (2008).** Foams and foam films stabilised by solid particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 13, p. 134–140.
- Howell, N.K., & Taylor, C. (1995).** Effect of ascorbic acid on the foaming and gelling of globular proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 30, p.321–334.
- Iametti, S., de Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996).** Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 237, p.106–112.
- Ibanoglu, E., & Karatas, S. (2001).** High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 47, p.31–36.
- Ikeda, S., & Morris, V.J. (2002).** Fine-stranded and particulate aggregates of heat-denatured whey proteins visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, 3, p.382–389.
- Indrawati, L., Wang, Z., Narsimhan, G., & Gonzalez, J. (2008).** Effect of processing parameters on foam formation using a continuous system with a mechanical whipper. *Journal of Food Engineering*, 88, p.65–74.
- Jakubczyk, E., & Niranjana, K. (2006).** Transient development of whipped cream properties. *Journal of Food Engineering*, 77, p.79–83.
- Jeronimidis, G. (1988).** Structure and properties of liquid and solid foams. En J. M. V. Blanshard, & J. R. Mitchell, *Food structure, its creation and evaluation* (p. 59–74). Londre: Butterworths.
- Jeyarajah, S. & Allen, J.C. (1994).** Calcium Binding and Salt-Induced Structural Changes of Native and Preheated β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, p.80–85.
- Ju, Z.Y., Hettiarachchy, N., & Kilara, A. (1999).** Thermal properties of whey protein aggregates. *Journal of Dairy Science*, 82, p.1882–1889.

- Kalnin, D., Ollivon, M., Keller, G., Bourgaux, C., & Lesieur, P. (2004).** Rôle des matières grasses dans la structure et la stabilité des systèmes dispersés alimentaires. *Communication personnelle, Programme CANAL*.
- Kato, A., Osako, Y., Matsudomi, N., & Kobayashi, K. (1983).** Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, p.33–37.
- Katsuka, K., Hatakeyama, M., & Hiraki, J. (1997).** Isothermal gelation of protein. En : Urea-induced gelation of whey proteins and their gelling mechanism. *Food Hydrocolloïds*, 11, p.367–372.
- Kella, N.K., & Kinsella, J.E. (1988).** Structural stability of β -lactoglobulin in the presence of kosmotropic salts. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 11, p.367–372.
- Ker, Y.C., & Toledo, R.T. (1992).** Influence of shear treatment on consistency and gelling properties of whey protein isolate suspensions. *Journal of Food Science*, 57, p.82–90.
- Kikuchi, M., Endo M., Yoshioka T., Watanabe R. & Matsumoto S. (1995).** Modelling and dynamic analysis of continuous whipping. *Milchwissen*, 50, p.129–133.
- Kilcast, D., & S. Clegg (2002).** Sensory perception of creaminess and its relationship with food structure. *Food Quality and Preference*, 13, p.609–623.
- Kim, D.A., Cornec, M., & Narsimhan, G. (2005).** Effect of thermal treatment on interfacial properties of β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285, p.100–109.
- Kinsella, J.E. (1981).** Functional properties of protein: possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry*, 7, p.273–288.
- Kinsella, J.E. (1984).** Relationships between structure and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21, p.197–262.
- Kitabatake, N., & Doi, E. (1982).** Surface tension and foaming of protein solutions. *Journal of Food Science*, 47, p.1218–1221.
- Krägel, J., Bree, M., Wüntneck, R., Makielski, A.V., Grigoriev, D.O., Senkel, O., Miller, R., & Fainerman, V.B. (1998).** Dynamics and thermodynamics of spread and adsorbed food protein layers at the water/air interface. *Nahrung*, 42, p.229–231.
- Kroezen, A.B.J., & Groot Wassink, J. (1987).** Bubble size distribution and energy dissipation in foam mixers. *Journal of the Society Dyers Colour*, 103, p.386–394.
- Kroezen, A.B.J., Groot Wassink, J. & Bertlein, E. (1988).** Foam generation in a rotor-stator mixer: schaumzeugung in einem rotor-stator mischer. *Chemical Engineering and Processing*, 24, p.145–156.

- Kulmyrzaev, A., Cancelliere, C., & McClements, D.J. (2000).** Characterization of aerated foods using ultrasonic reflectance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 46, p.235–241.
- Kulozik, U. (2008).** Structuring dairy products by means of processing and matrix design. En: *Food Materials Science. Principles and Practice*, Springer Science & Business Media, New York, p. 439–473.
- Labbafi, M., Bouaouina, H., Vial, C., Djelveh, G., Picgirard, L., Casalinho, J., & Schorsch, C. (2005).** Impact des technologies et des conditions opératoires du foisonnement sur l'élaboration de mousses laitières de type « topping ». *Science des Aliments*, 25, p. 281–395.
- Labbafi, M. (2006).** *Effets combinés des paramètres de formulation et de procédé pour la conduite de l'opération de foisonnement en continu d'une émulsion alimentaire*. Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- Laneuville-Ballester S. I. (2004).** *Etude de l'interaction associative entre la β -lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques*. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada.
- Lau, C.K., & Dickinson, E. (2004).** Structural and rheological properties of aerated high sugar systems containing egg albumen. *Journal of Food Science*, 69, p.E232–239.
- Lau, C.K., & Dickinson, E. (2005).** Instability and structural change in an aerated system containing egg albumen and invert sugar. *Food Hydrocolloids*, 19, p.111–121.
- Le Bon, C., Nicolai, T., & Durand, D. (1999).** Growth and structure of aggregates of heat denatured β -lactoglobulin. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, p.451–465.
- Lee, S.-Y., Morr, C.V., & Ha, E.Y.W. (1992).** Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH. *Journal of Food Science*, 57, p.1210–1213.
- Lefebvre, J., Renard, D., & Sanchez-Gimeno, A. C. (1998).** Structure and rheology of heat-set gels of globular proteins. I. Bovine serum albumin gels in isoelectric conditions. *Rheologica Acta*, 37, p.345–357.
- Leman, J., & Dolgan, T. (2004).** Effects of heating and pressurization on foaming properties of β -lactoglobulin. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology*, 7 (www.ejpau.media.pl).
- Le Meste, M., Colas, B., Simatos, D., Closs, B., Courthaudon, J.L., & Lorient, D. (1990).** Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein. *Journal of Food Science*, 55, p.1445–1447.

- Le Meste, M., Lorient, D., & Simatos, D. (2002).** *L'eau dans les aliments*. Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Editions Tec&Doc, Paris.
- Leser, M.E., & Michel, M. (1999).** Aerated milk protein emulsions – new microstructural aspects. *Current Opinion in Colloids and Interface Science*, 4, p.239–244.
- Lim, K.S., & Barigou, M. (2004).** X-ray micro-computed tomography of cellular food products. *Food Research International*, 37, p.1001–1012.
- Lin, M.Y., Lindsay H.M., Weitz, D.A., Ball, R.C., Klein, R., & Meakin, P. (1990).** Universal reaction-limited colloid aggregation. *Physical Review A*, 41, p.2005–2020.
- Lomakina, K., & Míková, K. (2006).** A study of the factors affecting the foaming properties of egg white – a review. *Czech Journal of Food Science*, 24, p.110–118.
- Ma, C., & Harwalkar, V.R. (1991).** Thermal analysis of food proteins. *Advances in Food and Nutrition Research*, 35, p.317–366.
- MacRitchie, F. (1990).** Chemistry at interfaces. Academic Press (Eds), Academic Press, San Diego, CA.
- Mahmoudi, N., Axelos, M., Desrumaux, A., Nicolai, T., Durand, D., & Riaublanc, A. (2006).** Ingénierie d'assemblages de protéines pour moduler la texture des émulsions alimentaires. 3^{ème} Congrès Mondial de l'Emulsion, Lyon, France.
- Mahmoudi, N. (2007).** *Impact de la structure sur les propriétés interfaciales d'agrégats de protéines globulaires du lactosérum*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France, p.82–142.
- Marin, I., & Relkin, P. (1999).** Foaming properties of *b*-lactoglobulin: impact of pre-heating and addition of isoamyl acetate. *International Journal of Food Science & Technology*, 34, p.517–522.
- Martin, A.H., Grolle, K., Bos, M.A., Cohen-Stuart, M.A., & van Vliet, T. (2002).** Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloids and Interface Science*, 254, p.175–183.
- Martinet, V., Valentini, C., Casalinho, J., & Schorsch, C. (2005).** Composition of interfacial layers in complex food emulsions before and after aeration: effect of egg to milk protein ratio. *Journal of Dairy Science*, 88, p.30–39.
- Mason, T.G., Bibette, J., & Weitz, D.A. (1995).** Elasticity of Compressed Emulsions. *Physical Review Letters*, 75, p.2051–2054.
- Mason, T.G., Bibette, J., Weitz, D.A. (1996).** Yielding and Flow of Monodisperse Emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179, p.439–448.

- Massey, A.H. (2002).** Air inclusion mechanisms and bubble dynamics in intermediate viscosity food systems. School of Food Biosciences. University of Reading, Reading.
- McClements, D.J. (1999).** *Food emulsions principles, practice and techniques*. New York, NY (USA), *CRC Press*, p. 9.
- McRitchie, F. (1991).** Air/water interface studies of protein. *Analitica Chimica Acta*, 249, p.241–245.
- Miller, R., Fairnerman, V.B., Makievski, A.V., Kragel, J., Grigoriev, D.O., Kazakov, V. N., Sinyachenko, O.V. (2000).** Dynamics of protein and mixed protein/surfactant adsorption layers at the water/fluid interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 86 (1-2), p.39–82.
- Miller, R., Krägel, J., Wüstneck, R., Wilde, P.J., Li, J.B., Fainerman, V.B., Loglio, G. & Neumann, A.W. (1998).** Adsorption kinetics and rheological properties of food proteins at air/water and oil/water interfaces. *Nahrung*, 42, p.225–228.
- Mitchell, J., Irons, L., & Palmer, G. J. (1970).** A study of the spread and absorbed films of milk proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure*, 200, p.138–150.
- Morr, C.V., & Josephson, R.V. (1968).** Effect of calcium, N-ethyl maleimide and casein upon heat-induced whey protein aggregation. *Journal of Dairy Science*, 51, p.1349–1355.
- Morr, C.V., & Foegeding, E.A. (1990).** Composition and functionality of commercial whey and milk protein concentrates and isolates: a status report. *Food Technology*, 44, p.100–112.
- Morr, C.V., & Ha, Y.W. (1993).** Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33, p.431–476.
- Mourouzidis-Mourouzis, S.A. & Karabelas, A.J. (2006).** Whey protein fouling of microfiltration ceramic membranes—Pressure effects. *Journal of Membrane Science*, 282, p.124–132.
- Müller-Fischer, N., Suppiger, D. & Windhab (2007).** Impact of static pressure and volumetric energy input on the microstructure of food foam whipped in a rotor-stator device. *Journal of Food Engineering*, 80, p.306–316.
- Mulvihill, D.M., & Donovan, M. (1987).** Whey proteins and their thermal denaturation. A review. *Irish Journal of Food Science and Technology*. 11, p.43–75.
- Narshiman, G., & Ruckenstein, E. (1995).** *Foams: Theory, Measurements and Applications*. New York, NY (USA): Marcel Dekker Inc. (p. 99).
- Nielson, M.A., Coulter, S.T., Morr, C.V., & Rosenau J.R. (1973).** Four factor response surface experimental design for evaluating the role of processing variables upon protein denaturation in heated whey systems. *Journal of Dairy Science*, 56, p.76–83.

- Niranjan, K., & Silva, S.F.J. (2008).** *Bubble-containing foods*. In : Food Materials Science. Principles and Practice. Springerlink, p.281–303.
- Nizo, (1979).** Brevet Néerlandais n° 7908455, 20-11-79.
- Patel, P.D., Stripp, A.M., & Fry, J.C. (1988).** Whipping test for determination of foaming capacity of protein: a collaborative study. *International Journal of Food Science & Technology*, 23, p.57–63.
- Patel, M.T., Kilara, A., Huffman, L.M., Hewitt, S.A., & Houlihan, A.V. (1990).** Studies on whey protein concentrates. I: Compositional and thermal properties. *Journal of Dairy Science*, 73, p.1439–1449.
- Paulsson, M., & Dejmek, P. (1990).** Thermal denaturation of whey proteins in mixtures with caseins studies by differential scanning calorimetry. *Journal of Dairy Science*, 73, p.590–600.
- Pernell, C.W., Foegeding, E.A, Luck, P.J. & Davis, J.P. (2002).** Properties of whey and egg white protein foams. *Colloid and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204, p.9–21.
- Peters, T. J. (1985).** Serum albumin. In: *Advances in Protein Chemistry*, 37, p.161–245.
- Phillips, L.G., & Kinsella, J.E. (1990).** *Food proteins*. Phoenix (USA): American Oil Chemist's Society, p. 52.
- Phillips, L.G., Whitehead, D.M., & Kinsella, J. (1994).** In: *Structure-Function Properties of Food Proteins*. Academic Press. San Diego.
- Philips, L.G., Hawks, S.E., & German, J.B. (1995).** Structural characteristics and foaming properties of β -lactoglobulin: Effects of shear rate and temperature. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 43, p.613–619.
- Plateau, J.A.F. (1861).** Mémoire de l'Académie Royale des Sciences de Belgique, 33, 5^{ème} et 6^{ème} séries.
- Pilhofer, G.M., Lee, H.C., McCarthy, M.J., Tong, P.S., & German, B. (1994).** Functionality of milk-fat in foam formation and stability. *Journal of Dairy Science*, 77, p.55–63.
- Princen, H.M., & Kiss, A.D. (1986).** Rheology of foams and highly concentrated emulsions : III. Static shear modulus. *Journal of Colloid and Interface Science*, 112, p.427–437.
- Princen, H.M., & Kiss, A.D. (1989).** Rheology of foams and highly concentrated emulsions : IV. An experimental study of the shear viscosity and yield stress of concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 128 (1), p.176–187.

- Privalov, P.L., & Khechinashvili, N.N. (1974).** A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: A calorimetric study. *Journal of Molecular Biology*, 86, p.665–684.
- Pugh, R.J. (1996).** Foaming, foam films, antifoaming and defoaming. *Advances in Colloid and Interface Science*, 64, p.67–142.
- Qi, X.L., Holt, C., Mc Nulty, D., Clarke, D.T., Brownlow, S., & Jones, G.R. (1997).** Effect of temperature on the secondary structure of β -Lactoglobulin at pH 6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis. *Biochemistry Journal*, 324, p.341–346.
- Raharitsifa, N., Genovese, D., & Ratti, C. (2006).** Characterization of apple juice foams for foam-mat drying prepared with egg white protein and methylcellulose. *Journal of Food Science*, 71, p.142–151.
- Raikos, V., Campbell, L., & Euston, R. (2007).** Effects of sucrose and sodium chloride on foaming properties of egg white proteins. *Food Research International*, 40, p.347–355.
- Rand, P.B., & Kraynik, A.M. (1983).** Drainage of aqueous foams: generation – pressure and cell – size effects. *Society of Petroleum Engineers Journal*, p.152–154.
- Relkin, P. (1996).** Thermal unfolding of β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, and bovine serum albumine. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, p.565–601.
- Renard, D., & Lefebvre, J. (1992).** Gelation of globular proteins: Effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation a simple model and its application to β -lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, p.287–291.
- Renard, D. (1994).** *Etude de l'agrégation et de la gélification des protéines globulaires: application à la β -Lg*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France.
- Renard, D., & Lefebvre, J. (1992).** Gelation of globular proteins: Effect of pH and ionic strength on the critical concentration for gel formation a simple model and its application to β -Lactoglobulin heat-induced gelation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14, p.287–291.
- Renard, D., Lefebvre, J., Griffin, M.C.A., & Griffin, W.G. (1998).** Effects of pH and salt environment on the association of β -lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 22, p.41–49.

- Renard, D., Lavenant, L., Sanchez, C., Hemar, Y., & Horne, D. (2002).** Heat-induced flocculation of microparticulated whey proteins (MWP); consequences for mixed gels made of MWP and β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 24, p.73–85.
- Richert, H. S., Morr, V. C., & Cooney, M. C. (1974).** Effect of heat and other factors upon foaming properties of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 39, p.42 – 48.
- Rodd, A.B., Dunstan, D.E. & Boger, D.V. (2000).** Characterisation of xanthan gum, solutions using dynamic light scattering and rheology. *Carbohydrate Polymers*, 42, p.159-174.
- Rodríguez Patino, J.M., Miñones, J.Jr., Millán, H., Jr., Pedroche, J.J., Carrera Sánchez, C., Pizones Ruíz-Henestrosa, V. (2007).** Interfacial and foaming properties of enzyme-induced hydrolysis of sunflower protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 21, p.782–793.
- Roefs, S.P.F.M., & Kruif, K.G. (1994).** A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry*, 226, p.883–889.
- Rosa, M.E., Fortes, M.A., & Vaz, M.F. (2002).** Deformation of three-dimensional monodisperse liquid foams. *European Physical Journal E*, 7, p.129.
- Roudaut, G., & Dacremont, C. (2002).** Crispness: a critical review on sensory and material science approaches. *Trends in Food Science and Technology*, 13, p.217–227.
- Rouimi, S., Schorsch, C., Valentini, C., & Vaslin, S. (2005).** Foam stability and interfacial properties of milk protein–surfactant systems. *Food Hydrocolloids*, 19, p.467–478.
- Roustel, S. (2000).** Ca gaze pour les mousses !, *revues ENILBIO*, 229, p.7–11.
- Rouyer, , F., Cohen-Addad, S., Hohler, R. (2005).** Is the yield stress of aqueous foam a well-defined quantity? *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 263, p.111–116.
- Rullier, B., Novales, B. & Axelos, M. (2008).** Effect of protein aggregates on foaming properties of β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 330, p.96–102.
- Russell, A.B., Cheney P.E. & Wantling, S.D. (1999).** Influence of freezing conditions on ice crystallization in ice cream. *Journal of Food Engineering*, 39, p.179–191.
- Sakurai, K., Oobatake, M., & Goto, Y. (2001).** Salt-dependent monomer–dimer equilibrium of bovine-lactoglobulin at pH 3. *Protein Science*, 10, p.2325–2335.
- Saint-Jalmes, A., Peugeot, M.L., Ferraz, H., Langevin, D. (2005).** Differences between protein and surfactant foams: microscopic properties, stability and coarsening. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 263, 219–225.

- Sanchez, C., & Paquin, P. (1997).** En *Food Proteins and their applications in foods*. Damodaran, S., Paraf, A., Eds., Marcel Dekker: New York, p. 503–528.
- Sanchez, C., Pouliot, M., Gauthier, S.F., & Paquin, P. (1997).** Thermal aggregation of whey protein isolate containing microparticulated or hydrolyzed whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, p.2384–2392.
- Schellman, J.A. (1987).** The thermodynamic stability of proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, 16, p.115–137.
- Schmitt, C., Bovay, C., Rouvet, M., Shojaei-Rami, S., & Kolodziejczyk, E. (2007).** Whey protein soluble aggregates from heatinf with NaCl. Physicochemical, interfacial, and foaming properties. *Langmuir*, 23, p.4155–4166.
- Schokker, E.P., Singh, H., & Creamer, L.K. (1999).** Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at neutral pH. *International Dairy Journal*, 9, p.791–800.
- Schokker, E.P., Singh, H., & Creamer, L.K. (2000).** Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalalbumin. *International Dairy Journal*, 10, p.843–853.
- Schorsch, C. (2007).** Formulation des mousses laitières. *Techniques de l'Ingénieur*, p. J 2 268–1 à J 2 268–11.
- Smith, A.K., Goff, H.D. and Kakuda Y. (2000).** Microstructure and rheological properties of whipped cream as affected by heat treatment and addition of stabilizer. *International Dairy Journal*, 10(4), p.295–301.
- Song, K.B., & Damodaran, S. (1987).** Structure-function relationship of proteins: adsorption of structural intermediates of bovine serum albumin at the air-water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, p.236–241.
- Spiegel, T. (1999).** *Thermische Denaturierung und Aggregation von Molkenproteinen in Ultrafiltrationsmolkenkonzentraten: Reaktions-kinetik und Partikulieren im Schabewärmetauscher*. Thèse de doctorat, TU München-Weihenstephan, Allemagne.
- Syrbe, A., Bauer, W.J. et Klostermeyer, H. (1998).** Polymer Science Concepts in Dairy Systems – An Overview of Milk Protein and Food Hydrocolloid Interaction. *International Dairy Journal*, 8, p.179–193.
- Swaisgood, H.E. (1982).** Chemistry of milk proteins. En *Developments in dairy chemistry - I. Proteins*. Editeur: Fox, P.F., London, Applied Science Publishers, p.1–59.
- Talansier, E. (2009).** *Etude du foisonnement par mélangeur statique appliqué à la structuration des mousses de blanc d'œuf dénaturé par traitement thermique*. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes, France.

- Tang, C.-H., Choi, S.-M., & Ma, C.-Y. (2007).** Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, p.96–104.
- Thakur, R.K., Vial, C., Nigam, K.D., Nauman, E.B., & Djelveh, G. (2003).** Static mixers in the process industries. A review. *Institution of Chemical Engineers (IChemE)*, 81, p.787–826.
- Thakur, R.K., Vial, C., & Djelveh, G. (2003a).** Influence of operating conditions and impeller design on the continuous manufacturing of food foams. *Journal of Food Engineering*, 60, p.9–20.
- Thakur, R.K., Vial, C., & Djelveh, G. (2005).** Combined effects of process parameters and composition on foaming of dairy emulsions at low temperature in an agitated column. *Journal of Food Engineering*, 68, p.335–347.
- Thakur, R.K., Vial, C., & Djelveh, G. (2006).** Effect of pH of food emulsions on their continuous foaming using a mechanically agitated column. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7 (3), p.203–210.
- Timasheff, S.N., & Townend, R. (1964).** Structure of β -Lactoglobulin tetramer. *Nature*, 203, p.517–519.
- Timasheff, S.N., Mescanti, L., Basch, J.J., & Townend, R. (1966b).** Conformational transitions of bovine β -lactoglobulins A, B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 241, p.2496–2501.
- Tosi, E., Canna, L., Lucero, H., & Ré, E. (2007).** Foaming properties of sweet whey solutions as modified by thermal treatment. *Food Chemistry*, 100, p.794–799.
- Townsend, A.A., & Nakai, S. (1983).** Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food protein. *Journal of Food Science*, 48, p.588–594.
- Turgeon, S. (1991).** *Amélioration des propriétés interfaciales et émulsifiantes d'un concentré protéique de lactosérum par traitement thermique et/ou enzymatique*. Thèse de doctorat des sciences, Université de Laval, Quebec.
- Townend, R., Winterbottom, R.J., & Timasheff, S.N. (1960).** Molecular interactions in β -lactoglobulin. II. Ultracentrifugal and electrophoretic studies of the association of β -lactoglobulin below its isoelectric point. *Journal of The American Chemical Society*, 82, p.3161–3168.
- Unterhalsberger, G., Schmitt, C., Sanchez, C., Appolonia-Nouzille, C., & Raemy, A. (2006).** Heat denaturation and aggregation of β -lactoglobulin enriched WPI in the presence of

arginine HCl, NaCl and guanidinium HCl at pH 4.0 and 7.0. *Food Hydrocolloids*, 20, p.1006–1019.

Unterhaslberger G., Schmitt, C., Shojaei-Rami, S., & Sanchez, C. (2007). β -lactoglobulin aggregates from heating with charged cosolutes: formation, characterization and foaming. En E. Dickinson & M.E. Leser (Eds.), *Food Colloids: Self-assembly and Material Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 175–191.

Utsumi S., Damodaran, S., & Kinsella, J.E. (1984). Heat-induced interaction between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and b-subunits of 7S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, p.1406–1412.

Van Aken, G.A. (2001). Aeration of emulsions by whipping. *Colloids and Surfaces A: Physico-chemical and Engineering Aspects*, 190, p.333–354.

Van der Plancken, I., van Loey, A., & Hendrickx, M.E. (2006). Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study. *Journal of Food Engineering*, 75, p.316–326.

Van der Plancken, I., van Loey, A., & Hendrickx, M.E. (2007). Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. *Journal of Food Engineering*, 78 (4), p.1410–1426.

Vandewalle, N., & Lentz, J.F. (2001a). Cascades of popping bubbles along air/foam interfaces. *Physical Review E*, 64 (2), 4 pages.

Vandewalle, N., Lentz, J.F., Dorbolo, S., & Brisbois, F. (2001b). Avalanches of popping bubbles in collapsing foams. *Physical Review Letters*, 86, p.179–182.

Varunsatian, S., Watanabe, K., Hayakawa, S., & Nakamura, R. (1983). Effects of Ca^{++} , Mg^{++} and Na^{+} on heat aggregation of whey protein concentrates. *Journal of Food Science*, 48, p.42–46 et 70.

Verheul, M., Roefs, S.P.F.M., & De Kruif, K.G. (1998). Kinetics of heat-induced aggregation of β -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, p.896–903.

Vial, C., Thakur R.K., Pérez Quintáns, A., Djelveh, G., & Picgirard, L. (2006). Continuous manufacturing of a light-textured foamed fresh cheese by dispersion of a gas phase. II. Influence of formulation. *Journal of Food Engineering*, 77, p.14–26.

Walstra, P. (1989). Principles of foam formation and stability. In *Foams: Physics, Chemistry and Structure* (ed. A.J. Wilson), p. 1–15, Springer-Verlag, Berlin.

Walstra, P., & de Roos, L. A. (1993). Proteins at air–water and oil–water interfaces: Static and dynamic aspects. *Food Reviews International*, 9, p.503–525.

Weijers, M., Barneveld, P.A., Cohen-Stuart, M.A., & Visschers, R.W. (2004). Denaturation, aggregation and gelation kinetics of chicken egg white ovalbumin at neutral pH. 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, p.615–616.

Weijers, M. (2005). *Aggregate morphology and network properties of ovalbumin*. Thèse, Université de Wageningen, Wageningen, Pays-bas.

Wilde, P.J., & Clark, D.C. (1996). In: G.M. Hall, Editor, *Methods of testing protein functionality*, Blackie Academic and Professional, London, p.110–152.

Wildmoser, H., Scheiwiller, J., & Windhab, E.J. (2003). Impact of disperse microstructure on rheology and quality aspects of ice cream. *Communication in “3rd International Symposium on Food Rheology and Structure”*, Zürich, Suisse.

Windhab, E. (1991). Zur Technologie geschäumter Stoffsysteme im Lebensmittelbereich, Teil II. *Lebensmitteltechnik*, 4, p.181–183.

Windhab, E.J. (2003). Rheology and microstructure keys for quality processing of food systems. 3rd International Symposium on Food Rheology and Structure, p.103–112.

Xiong, Y.L., Dawson, K.A. & Wan, L. (1993). Thermal aggregation of β -lactoglobulin : Effect of pH, ionic environment, and thiol reagent. *Journal of Dairy Science*, 76, p.71–77.

Zhu, H., & Damodaran, S. (1994). Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, p.846–855.

<http://www.hobart.fr/prod-hsm10.htm>

<http://www.fao.org/docrep/field/003/AC027F07.htm>

www.sulzerchemtech.com, brochure Sulzer Chemtech. Mixing and reaction technology – The pace making technology, worldwide.

TITRE DE LA THÈSE EN FRANÇAIS :

ETUDE DU COUPLAGE PROCÉDÉ/PRODUIT LORS DE LA PRODUCTION DES MOUSSES PAR DES AGREGATS PROTEIQUES

RESUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS

L'objectif de cette thèse consiste à comprendre les interactions procédé/produit et à mettre en évidence les paramètres d'influence (conditions du traitement thermique, formulation, paramètres opératoires de foisonnement) afin de maîtriser les propriétés d'usage, et notamment la microstructure des produits foisonnés stabilisés par des agrégats de protéines sériques (WPI).

Une première étude nous a permis d'évaluer l'impact du traitement thermique sur la solution protéique (proportion, taille, morphologie des assemblages protéiques) et sur l'aptitude au foisonnement des WPI natives et dénaturées lorsqu'un procédé de bullage a été utilisé.

Dans un deuxième temps, à l'aide d'un batteur ménager nous avons mis en avant le rôle clef joué par les agrégats solubles sur l'amélioration de la stabilité et sur celle de la texture des mousses en l'absence de matière grasse. En revanche, l'application d'un post-traitement thermique sévère s'est avérée défavorable à la stabilité et la rigidité de la mousse.

L'utilisation de deux foisonneurs continus a ensuite permis de démontrer le couplage entre formulation et procédé. Lorsqu'on applique un traitement thermique $\geq 80^{\circ}\text{C}$ en amont du foisonnement sur l'installation rotor-stator, celui-ci semble améliorer d'une manière significative la texture des mousses et a confirmé que leur stabilité dans le temps reste gouvernée par l'état de dénaturation et d'agrégation des protéines, les conditions opératoires ne jouant ici qu'un rôle secondaire. En revanche, lors du foisonnement dans une colonne à faible entrefer, cet effet bénéfique du traitement thermique sur la stabilité et sur la texture est masqué par les effets du procédé et aucune amélioration n'a été observée.

Mots clés : isolat de protéines sériques, traitement thermique dynamique, agrégats protéiques, foisonnement, propriétés des mousses.

TITRE DE LA THÈSE EN ANGLAIS :

STUDY OF THE PROCESS/PRODUCT RELATIONSHIP DURING THE PRODUCTION OF FOOD FOAMS STABILIZED BY WHEY PROTEIN AGGREGATES

RESUMÉ DE LA THÈSE EN ANGLAIS

The aim of this study is to understand the interactions between molecular product/process and to estimate the influencing factors (e.g. thermal treatment, ingredients and operating conditions) in order to control foam properties, i.e. the microstructure of foamed products stabilized by aggregates of whey proteins (WPI).

A first study allowed us to estimate the impact of the dynamic thermal treatment on the WPI solution (amount, size and morphology of the protein aggregates), and also on the foaming ability of native or heat-treated whey proteins when a bubbling technique was used.

Secondly, foams produced using a batch mixer allowed us to highlight the key role played by the soluble fraction of protein aggregates in improving the stability against drainage and the texture of protein foams without fat. On the other hand, the application of a severe post-treatment to WPI solutions was shown to be unfavourable to the stability and to the rigidity of protein foams.

By using a continuous rotor-stator device and a narrow annular gap unit, we have clearly demonstrated the relationship between the process/product interactions. When a thermal treatment superior or equal to 80°C was applied before foaming on the rotor-stator, this seemed to improve significantly foam rigidity and confirmed that foam stability over time remained essentially governed by the denaturation and aggregation degrees of whey proteins, the operating conditions playing only a secondary role. On the other hand, when a narrow annular gap unit was used, this beneficial effect of heat treatment on stability against drainage and also on foam texture was hidden by process variables and no apparent improvement was observed.

Keywords: whey protein isolate, dynamic heat treatment, protein aggregates, foaming, foam properties.